



SCREENING ENTOMOPATHOGENER PILZE  
MIT POTENTIAL ZUR  
FORMULIERUNG VON BIOAGENTIEN

ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN  
DEPARTEMENT FÜR LIFESCIENCE UND FACILITY MANAGEMENT  
INSTITUT UINR

**Bachelorarbeit**

vorgelegt von

**Adrian Rutzer**

im Oktober 2019

**Erstprüfer:** Herr Prof. Dr. Jürg Grunder  
ZHAW Life Sciences and Facility Management, Grüental, 8820 Wädenswil

**Zweitprüfer:** Frau Dr. Esther Fischer  
ZHAW Life Sciences and Facility Management, Grüental, 8820 Wädenswil

# Impressum

## Schlagwörter

*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *M. brunneum*, *M. robertsii*, *Isaria fumosorosea*, *Galleria mellonella*, Bioassay, Virulenz, Morphologie, Degeneration, Kaplan-Meier-Modell, biologische Schädlingsbekämpfung, Pflanzenschutz

## Zitiervorschlag

Rutzer, A., (2019). Screening entomopathogener Pilze mit Potenzial zur Formulierung von Bioagentien. Bachelorarbeit ZHAW Wädenswil, unveröffentlicht.

## Adresse

Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen IUNR  
Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften ZHAW  
Grüntal, Postfach  
CH-8820 Wädenswil

## Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Jürg Grunder für seine nützlichen Kommentare, Anmerkungen und sein Engagement im Rahmen dieser Bachelorarbeit bedanken. Ausserdem möchte ich mich bei Dr. Esther Fischer für die Zusammenarbeit zu diesem Thema bedanken. Besonderen Dank geht an Ursula Löffel, die mich in allen Laborangelegenheiten vollumfänglich unterstützt hat. Für die statistischen Erläuterungen danke ich Dr. Matthias Nyfeler.

# Abstract

Entomopathogenic fungi are promising alternatives to chemical-synthetic pest control. A serious problem in (mass-) production with conidia-to-conidia cycles is the decrease of their virulence against the target organism. This phenomenon, including morphological degenerations (altered growth rate and colour or reduced sporulation), can be induced by serial sub culturing. Decreasing virulence and morphological degenerations inevitably lead to products of inferior quality. The virulence of entomopathogenic fungi and their consistency are therefore a decisive selection criterion for fungal strains with potential for commercialization. The main objectives of this work were to determine the virulence of selected fungal strains and their loss in tenfold serial subcultivation on fresh culture media. Additionally, changes in growth rate and phenotype (shape and color) were determined. Two strains each of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *M. brunneum* and *M. roberstii*, as well as one strain of *Isaria fumosorosea* were analysed.

The results confirm the phenomenon of decreasing virulence and the consequent difficulties in the mass production of entomopathogenic fungi. Morphological degeneration was found in six of the nine fungi tested. The growth rate decreased in four fungi significantly. Both *B. bassiana* strains proved to be the most stable of all examined factors under consideration. A trend between decreasing virulence and morphological changes was identified. A more detailed analysis in this field of research could greatly simplify the selection of potential bioagents. Furthermore, decisive implications for the proper handling of a mycotheca could result from these experiments. The work also includes important information about the potential of newly isolated fungal strains and can be used as a basis for further research of similar characteristics.



# Zusammenfassung

Entomopathogene Pilze sind vielversprechende Alternativen zu der chemisch-synthetischen Schädlingsbekämpfung. Ein ernstzunehmendes Problem bei der (Massen-) Vermehrung mit Konidien-zu-Konidien-Zyklen ist die Abnahme ihrer Virulenz gegenüber dem Zielorganismus. Dieses Phänomen kann unter anderem mit morphologischen Degenerationen (veränderte Wachstumsrate und Farbe oder reduzierter Sporulation) durch seriell Subkultivieren hervorgerufen werden. Abnehmende Virulenz und morphologische Degenerationen führen zwangsweise zu Produkten minderer Qualität. Die Virulenz entomopathogener Pilze und ihre Konsistenz ist daher ein massgebliches Auswahlkriterium für Pilzstämme mit Potenzial zur Kommerzialisierung. Hauptziele dieser Arbeit waren die Bestimmung der Virulenz ausgewählter Pilzstämme und deren Verlust bei zehnmaligem, seriellen Subkultivieren auf frischen Nährmedien. Zusätzlich wurden Veränderungen in Wachstumsrate und Phänotyp (Form und Farbe) bestimmt. Jeweils zwei Pilzstämme von *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *M. brunneum* und *M. roberstii*, sowie ein Stamm von *Isaria fumosorosea* wurden auf die genannten Probleme untersucht.

Die Resultate bestätigen das Phänomen der abnehmenden Virulenz und die daraus entstehenden Schwierigkeiten bei der Massenproduktion von entomopathogenen Pilzen. Morphologische Degenerationen konnten bei sechs der neun getesteten Pilze nachgewiesen werden. Die Wachstumsrate verminderte sich bei vier Pilzen signifikant. Beide *B. bassiana*-Stämme erwiesen sich unter Betrachtung aller untersuchten Faktoren am stabilsten. Ein tendenzieller Zusammenhang zwischen abnehmender Virulenz und morphologischen Veränderungen konnte festgestellt werden. Eine genauere Untersuchung dieses Forschungsfeldes könnte die Auswahl potenzieller Bioagentien massgeblich vereinfachen. Weiter können aus den Versuchen entscheidende Rückschlüsse über die sachgerechte Handhabung einer Mykothek gezogen werden. Die Arbeit beinhaltet ebenso wichtige Informationen über das Potential neu isolierter Pilzstämme und kann als Grundlage für weitere Untersuchungen ähnlicher Art genutzt werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Die Biologie entomopathogener Pilze</b>	<b>12</b>
3.1	Die wichtigsten Gruppen entomopathogener Pilzen und Oomyceten	13
3.1.1	Stramenopila (Oomycota) . . . . .	14
3.1.2	Microsporidia . . . . .	15
3.1.3	Zoosporen ausbildende Pilze (eng. zoosporic fungi) . . .	16
3.1.4	“Zygomycota” (eng. zygotic fungi) . . . . .	16
3.1.5	Basidiomycota . . . . .	17
3.1.6	Ascomycota . . . . .	18
3.2	Infektionsprozess . . . . .	20
3.3	Abwehrreaktionen des Wirtes . . . . .	24
<b>4</b>	<b>Mortalitätsanalysen mit entomopathogenen Pilzen</b>	<b>27</b>
4.1	Die Komplexität der abnehmenden Virulenz entomopathogener Pilze ( <i>in vitro</i> ) . . . . .	27
4.1.1	Die Schwierigkeit klarer Gen-Effekt-Deklarationen . . . .	27
4.1.2	Vergleichbarkeit von Studien . . . . .	29
4.2	Bestimmung der Virulenz . . . . .	30
4.3	Durchführung von Mortalitätsanalysen . . . . .	30
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>32</b>
5.1	Inokulation der Pilzkulturen . . . . .	32
5.2	Messung des Pilzwachstums . . . . .	33
5.3	Mortalitätstest zur Bestimmung der Virulenz mit <i>Galleria mellonella</i> -Larven (Grosse Wachsmotte) . . . . .	34
5.3.1	Herstellung der Sporen-Suspensionen . . . . .	35
5.3.2	Durchführung Mortalitätsanalyse . . . . .	36
5.4	Statistische Auswertung . . . . .	37

<b>6 Resultate</b>	<b>39</b>
6.1 Morphologische Veränderungen der Pilzkulturen . . . . .	39
6.2 Flächenveränderung im Pilzwachstum . . . . .	41
6.3 Mortalitätstest zur Bestimmung der Virulenz mit <i>Galleria mel-</i> <i>lonella</i> - Larven (Grosse Wachsmotte) . . . . .	43
6.3.1 Anzahl isolierter Sporen . . . . .	43
6.3.2 Mortalitätsanalyse . . . . .	43
<b>7 Diskussion</b>	<b>47</b>
7.1 Morphologische Veränderungen . . . . .	47
7.2 Pilzwachstum . . . . .	48
7.3 Mortalitätsanalyse . . . . .	49
7.4 Potential der untersuchten Pilze als Bioagentien . . . . .	53
7.5 Reflektion Methodik . . . . .	55
7.5.1 Inokulation der Pilzkulturen und die Messung des Pilzwachs- tums . . . . .	55
7.5.2 Mortalitätstest zur Bestimmung der Virulenz mit Galle- ria mellonella Larven . . . . .	56
7.5.3 Statistische Auswertung . . . . .	57
7.6 Konklusion und Ausblick . . . . .	58
<b>Literatur</b>	<b>60</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>Appendix A: Verfahren</b>	<b>I</b>
A.1 Rezept Corn Steep Agar . . . . .	I
A.2 Berechnungsformel Neubauer-Zählkammer . . . . .	II
A.3 R Skript . . . . .	III
<b>Appendix B: Rohdaten aus dem Kaplan-Meier-Modell</b>	<b>VI</b>
<b>Appendix C: Abgabemodalitäten</b>	<b>XV</b>

# 1 Einleitung

Im Reich der Tiere dominieren die Insekten mit mehr als einer Million beschriebenen Arten. Nur ca. 1% der beschriebenen Insektenarten stehen in Konkurrenz mit der menschlichen Lebensweise. Sie schädigen Hab und Gut, Nutzpflanzen, Lagerprodukte oder wirken als Vektoren für (Pflanzen-)Pathogene und können dadurch enormen Schaden verursachen (Pedigo & Rice, 2009). Der Einsatz chemisch-synthetischer Pestizide ist eine der Hauptstrategien, um solch schädliche Organismen zu bekämpfen. Ihre Anwendung kann sich aber (1) negativ auf die Umwelt auswirken (Mahmood et al., 2015), (2) begünstigt Resistenzbildungen der Schädlinge gegenüber den Pestiziden (Hemingway, 2018) und (3) kann negative Effekte auf Nicht-Zielorganismen haben (Kaya & Vega, 2012; Müller et al., 2019). Die immer besser nachweisbaren Probleme mit chemisch-synthetischen Pestiziden haben ein weltweites Interesse an der Entwicklung praxistauglicher Alternativen geweckt. So zum Beispiel der Ansatz des Integrierten Pflanzenschutz (IPM; eng. integrated pest management) in der Pflanzenproduktion. Mit ihm wird versucht eine breite Palette verschiedener Managementtechniken zu kombinieren. Dazu gehören Betriebshygiene, Monitoring, einschliesslich der Verwendung von Fallen, der Anbau resistenter Sorten und spezifischer Begleitflora, eine optimierte Kulturführung oder die biologische Kontrolle von Schadorganismen (Butt & Goettel, 2000; Skinner, Parker & Kim, 2014). Unter biologischer Kontrolle (eng. biological control oder biocontrol) wird die Erforschung und Verwendung lebender Organismen zur Unterdrückung von Schädlingspopulationen verstanden (Eilenberg, Hajek & Lomer, 2001). Diese Organismen fungieren als Prädatoren, Parasitoide oder entomopathogene Erreger. Entomopathogene Organismen besitzen die Fähigkeit Insekten und andere Arthropoden zu infizieren, sich von ihnen zu ernähren und dabei häufig abzutöten (aus dem Griechischen *entoma* = Insekt, *pathos* = Leiden, *gennaein* = Produzieren; ein Synonym für «insektenpathogen», (Kaya & Vega, 2012; Skinner et al., 2014). Im Bereich der entomopathogenen Organismen ist neben der Verwendung von Viren, Bakterien oder Nematoden der Gebrauch von entomopathogenen Pilzen (EPF; eng. entomopathogenic fungi) als biologisches Pestizid eine vielversprechende Alternative zur chemisch-synthetischen Schädlingsbekämpfung (Kaya & Vega, 2012; Khosravi et al., 2015; Skinner et al., 2014).

Entomopathogene Pilze (EPF) sind wichtige natürliche Feinde vieler Insekten- und Milbenarten und leisten einen massgeblichen Beitrag zu deren Regulierung mit minimal nachweisbaren Auswirkungen auf die Umwelt (Roy et al., 2010). Goettel, Eilenberg und Glare (2005); Lovett und St. Leger (2017); P. A. Shah und Pell (2003) oder Skinner et al. (2014) erforschten das Potenzial bzw. die Wichtigkeit entomopathogener Pilze als Bioagentien in IPM-Programmen. So sind EPF für Produzenten in vielen Teilen der Welt als Produkte für die Kontrolle schädlicher Arthropoden im Handel verfügbar (F. E. Vega, Meyling, Luangsa-ard & Blackwell, 2012). Faria und Wraight (2007) beschrieben eine Vielzahl von Bioagentien auf Basis verschiedener EPF die seit 1960 entwickelt wurden. Dabei sind Produkte mit den Pilzen *Beauveria bassiana* (33.9%), *Metarhizium anisopliae* (33.9%), *Isaria fumosorosea* (5.8%) und *B. brongniartii* (4.1%) am zahlreichsten unter den in dieser Studie 171 betrachteten Präparaten vertreten. Am häufigsten werden sie gegen die Insektenordnungen Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Thysanoptera und Orthoptera, verteilt über 48 Familien, eingesetzt. Insgesamt 28 dieser Produkte können zur Kontrolle von Acari eingesetzt werden, wobei aber nur drei ausschliesslich als Akarizid entwickelt wurden, alle basierend auf *Hirsutella thompsonii*.

Auf der Suche nach kommerzialisierbaren EPF müssen in einem ersten Schritt Pilze von erkrankten Insekten, Insektenkadavern oder der Umwelt isoliert und identifiziert werden. Danach müssen sie unter Laborbedingungen bewertet und die vielversprechendsten Kandidaten ausgewählt werden. Dabei müssen gleichzeitig mehrere kritische Faktoren beurteilt werden: u.a. die Virulenz, das Potenzial zur Massenproduktion, geeignete Lagereigenschaften (Haltbarkeit), die Kompatibilität mit chemischen Insektiziden/Fungiziden und natürlichen Feinden des Schädlings, ihre Persistenz, Einfachheit der Anwendung und schlussendlich die Effizienz unter Feldbedingungen (Butt & Goettel, 2000; Skinner et al., 2014). Von diesen Faktoren ist die Virulenz eines Pilzes neben der Möglichkeit zur einfachen und günstigen Massenproduktion ein massgeblicher Faktor für den späteren Erfolg des Produktes (Brown & Khan, 2009; Lohmeyer & Miller, 2007; Valero-Jiménez et al., 2016; F. E. Vega et al., 2012; Skinner et al., 2014).

Die Virulenz ist ein Teil des Begriffs Pathogenität. Pathogenität wird üblicherweise als die Fähigkeit eines Organismus, Krankheiten zu verursachen, definiert. In diesem Sinne ist die Pathogenität ein Alles-oder-Nichts Phänomen. Ein Organismus ist gegenüber seinem Wirt pathogen oder nicht. Demgegenüber steht die Virulenz als eine quantifizierbare Variable, um die Fähigkeit eines Organismus, eine Krankheit zu verursachen, zu beschreiben. Sie kann abhängig von verschiedenen abiotischen und biotischen Faktoren sein. Im Allgemeinen wird Pathogenität auf Gruppen oder Arten angewendet. Die Virulenz dagegen dient mehrheitlich dem Vergleich dieser Gruppen (Shapiro-Ilan et al., 2005; Watson & Brandly, 1949). Ein bekanntes und ernstzunehmendes Problem bei der (Massen-) Produktion von EPF-Produkten oder vergleichenden Bioassays ist der Verlust ihrer Virulenz gegenüber Wirtsorganismen und/oder Degenerationen ihrer Morphologie (Farbe, Wachstumsform oder reduzierte Sporulation). Dieses Phänomen kann vor allem bei serieller Subkultivierung auf künstlichen Nährmedien beobachtet werden, was zu Produkten minderer Qualität führt (Brownbridge, Costa & Jaronski, 2001; Butt, Wang, Shah & Hall, 2006; Humber, 2012a; Vandenberg & Cantone, 2004).

## 2 Zielsetzung

In der Masterarbeit von Mustafa (2016) «*Natural state of entomopathogenic fungi and the impact of their input on the biological control of cockchafer grubs (Melolanthia sp.)*» wurden neue Pilzstämme aus den Gattungen *Beauveria*, *Isaria*, und *Matharizium* mit Potenzial zur Formulierung von Bioagentien isoliert. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand einer Auswahl dieser Pilze das Problem der abnehmenden Virulenz und morphologischen Veränderungen bei serieller Subkultivierung untersucht. Das Hauptziel war dabei die Bestimmung der Virulenz neu isolierter Pilzstämme. Weiter sollen mit dieser Arbeit Grundsteine für weitere Arbeiten ähnlicher Art gelegt werden und aufschlussreiche Rückschlüsse über die Handhabung von Mykotheken gezogen werden können. Schlussendlich werden anhand der gesammelten Daten Empfehlungen für zukünftige Untersuchungen gemacht. Für die Strukturierung der Arbeit wurden folgende Hypothesen formuliert:

*Kann bei den neun untersuchten Pilzen mit einer zehnfach serieller Subkultivierung eine Abnahme der Virulenz bewiesen werden?*

### **Hypothese 1**

Durch serielles Subkultivieren entomopathogener Pilze auf frische Nährmedien vermindert sich die Virulenz massgeblich.

### **Prognose 1**

Der Verlust der Virulenz ist stammesabhängig. So wurde bei *B. bassiana*, *I. fumosorosea*- oder *M. anisopliae*-Stämmen nach 15 oder mehrmaliger Subkultivierung ein kompletter Verlust der Virulenz aber ebenso keinerlei Abnahme derer beschrieben (Butt et al., 2006). Eine Abnahme der Virulenz ist dennoch über alle in dieser Arbeit untersuchten Pilzstämme gesehen nachweisbar.

*Können morphologische Veränderungen bei den untersuchten Pilzstämmen nachgewiesen werden?*

### **Hypothese 2**

Der Phänotyp (hier Form und Farbe) der untersuchten Pilze verändert sich nicht.

### **Prognose 2**

Degenerationen im Phänotyp beziehen sich abgesehen von Farbe und Form (sowie Wachstumsrate) häufig auf die Menge produzierter Sporen oder die Produktion bestimmter Metaboliten. Die Analyse dieser Grössen hätte den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit überschritten.

### **Hypothese 3**

Das Pilzwachstum verändert sich bei zehnfach serieller Subkultivierung auf frische Nährmedien nicht.

### **Prognose 3**

Viele Studien weisen auf keine oder nur geringfügige Veränderungen in der Wachstumsrate bei *in vitro* Subkultivierung von entomopathogenen Pilzen hin. In dieser Arbeit wird daher eine Bestätigung der Hypothese erwartet.



### 3 Die Biologie entomopathogener Pilze

Als heterotrophe, eukaryotische Mikroorganismen ist es Pilzen nicht möglich selbst Kohlenstoff zu fixieren. Als primäre Energiequelle nutzen sie daher organische Verbindungen anderer Organismen. Sie erreichen dies durch eine saproprobe Lebensweise (d. h. durch den Verzehr toter organischer Substanz), leben in Symbiose mit Algen oder Wurzeln oder als Parasiten von Tieren, Pflanzen und anderen Pilzen (F. E. Vega et al., 2012). Zwischen Insekten und Pilzen sind verschiedene Beziehungen mit teils grosser Abhängigkeit bekannt. Sie zeigen sich unter anderem in mutualistischen Endosymbiosen (Suh et al., 2005), an pilzzüchtenden Insekten (z. B. Blattschneiderameisen (*Attini*), Mueller et al. (2005)) oder Pilzen mit entomopathogener Wirkung (Lacey et al., 2015). Letzteres wird in dieser Arbeit genauer behandelt.

Die Wechselwirkungen zwischen Pilz, Wirt und Umwelt stehen in einem empfindlichen Gleichgewicht (Goettel et al., 2005). So auch die Entomopathogenität, die sich unabhängig und wiederholt in allen grossen Stämmen des Pilzreiches ausgebildet hat (Araújo & Hughes, 2016). EPF besitzen aber die Fähigkeit ihren Lebenszyklus je nach Wirtsstadium und Umweltbedingung zu organisieren und anzupassen (Butt, Jackson & Magan, 2001, S.71-153). Gleichwohl beginnt im Allgemeinen der Zyklus mit einem infektiösen Sporenstadium, das an der Kutikula des Wirtes anheftet, keimt und mit einem sogenannten Keimschlauch in das Hämocoel (Körperhülle des Insekts) des Wirtes eindringt (Hajek & St. Leger, 1994). Gelingt es dem Pilz die Kutikula, die bei dem Infektionsvorgang als erste physikalische Barriere gilt, und die angeborene Immunabwehr des Wirtes zu überwinden, vermehrt sich der Pilz im Innern des Wirtes (Qu & Wang, 2018). Der häufig eintretende Tod des Wirtes ist auf die erwähnte Vermehrung oder Toxin-Produktion des Pilzes zurückzuführen. Unter günstigen Umweltbedingungen wächst der Pilz aus dem Kadaver heraus, bildet Konidienträger oder analoge Strukturen und sporuliert. Alternativ gehen viele Arten in eine Ruhephase über, in der sie in der Lage sind, langanhaltend ungünstige Umweltbedingungen zu überstehen, bevor sie erneut eine Art Sporen bilden und freisetzen. Es ist wichtig anzumerken, dass es Variationen und Ausnahmen des beschriebenen Lebenszyklus gibt. Entscheidend sind jedoch Umweltbedingungen und die Wirte für das Überleben und Vermehren der Pilze (Goettel et al., 2005).

Für das Verständnis des Virulenzverlustes von Pilzen bei mehrfacher Subkultivierung auf frischen Nährmedien sind genauere Kenntnisse über Infektionsprozess und Wechselwirkungen zwischen Wirt und Parasit notwendig. Zuvor werden aber die nach Araújo und Hughes (2016) wichtigsten Pilzgruppen, die Entomopathogenität entwickelt haben, kurz beschrieben. In der Regel sind viele der hier vorgestellten Gruppen nicht geläufig (Araújo & Hughes, 2016). Zudem hat sich seit dem Beginn des «DNA-Sequencing» die phylogenetische Klassifizierung der Pilze dramatisch verändert

### 3.1 Die wichtigsten Gruppen entomopathogener Pilzen und Oomyceten

Anfangs der 90er Jahre begann der taxonomische Umsturz im Reich der Pilze mit den PCR (eng. polymerase chain reaction)-Analysen ribosomaler RNA (T. White, Bruns, Lee & Taylor, 1990). Ein weiterer Wendepunkt geschah mit der Studie «*Reconstructing the early evolution of the fungi using six gene phylogeny*» von James, Kauff et al. (2006). Sie untersuchten einen Datensatz bestehend aus sechs Genregionen (nu-SSU, -LSU, 5.8S rRNA, rpb1, rpb2 und tef1), die in fast 200 Arten aus jeder grossen Pilzgruppe (einschliesslich Microsporidia) nachgewiesen werden konnten und beeinflussten damit die heutige phylogenetische Einteilung der Pilze entscheidend.

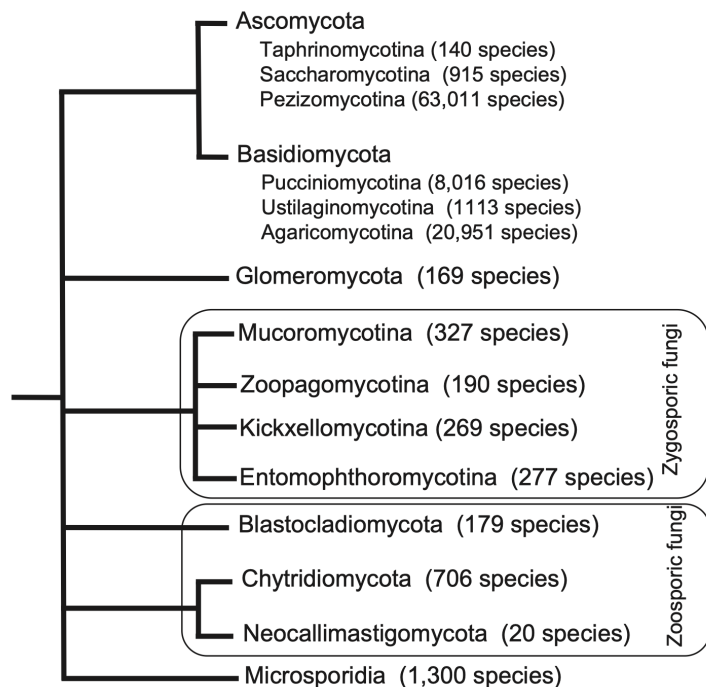


Abbildung 1: Eine schematische Darstellung der Beziehungen zwischen den Pilz-Taxa nach Blackwell (2011) und Hibbett et al. (2007) und der ungefähren Anzahl Arten in jeder Gruppe (Kirk et al., 2008). Darstellung aus F. E. Vega et al. (2012), unverändert.

Die hier gewählte Klassifikation verwendet eine Hierarchie, eingeteilt in sieben Gruppen, mit deren Suffixe Rückschlüsse auf die jeweilige taxonomische Einheit gezogen werden können (ausschliesslich Microsporidia; siehe Tabelle 1:

Tabelle 1: Die Suffixe der taxonomischen Gruppierungen nach Hibbett et al. (2007)

Taxonomische Einheit	Suffix
Ordnung	-ales
Subklasse	-mycetidae
Klasse	-mycetes
Substamm	-mycotina
Stamm	-mycota
Subreich und Königreich	

### 3.1.1 Stramenopila (Oomycota)

Aufgrund zahlreicher ökologischer und morphologischen Ähnlichkeiten (verwandte Ernährungsweisen und Besiedlung ähnlicher Habitate respektive die Bildung eines komplex verzweigten Hyphensystem) wurden die zu den Oomycota gehörenden Arten lange zum Reich der Pilze gezählt (Dick, 2001; Lamour & Kamoun, 2008; Richards et al., 2006). Oomyceten besitzen aber Zellwände, die üblicherweise aus Cellulose anstatt Chitin bestehen, haben eine zweifach-begeisselte Zoospore (eng. biflagellate zoospores) oder unterscheiden sich von den Pilzen durch den Zeitpunkt der Meiose. Bei den meisten Pilzen findet diese während der Sporenbildung statt (eng. sporic meiosis). Bei den Oomyceten geschieht die Meiose während der Gametenbildung (eng. gametic meiosis). Ebenso verdeutlichen phylogenetische Analysen ribosomaler DNA (rDNA) und anderen Genen die Verwandtschaft zu zum Beispiel Braun- oder Kieselalgen (Beakes, Glockling & Sekimoto, 2012; Goettel et al., 2005; Lamour & Kamoun, 2008; F. E. Vega et al., 2012). Sie wurden daher in die Stramenopila gelegt, ein Königreich mit morphologisch vielfältigen Organismen wie *Labyrinthulomycetes* (Netzschleimpilze), *Ciliophora* (Wimpertierchen) oder *Phaeophyceae* (Beakes et al., 2012).

Oomyceten haben sowohl parasitäre als auch saprophytische Lebensweisen entwickelt und sind in der Lage ein weites Spektrum an Wirten zu infizieren. Zu ihnen gehören Algen, Pflanzen, Protisten, Pilze, Arthropoden und Wirbeltiere, einschliesslich dem Menschen (Kamoun, 2003; Phillips et al., 2008). Dennoch sind nur einige Arten entomopathogen. Zu den am besten untersuchten Arten ge-

hört *Lagenidium giganteum* (Lagenidiales), der Mückenlarven infiziert (Goettel et al., 2005; Scholte et al., 2004; Vyas et al., 2007). Eine gute Zusammenfassung über entomopathogene Oomycota liefert Phillips et al. (2008).

### 3.1.2 Microsporidia

Microsporidia sind obligate intrazelluläre Parasiten von Tieren und wurden lange zu den Protozoen gezählt. Immer mehr Studien unterstützen aber die Hypothese, dass Microsporidia den Pilzen zugehörig sind (Hirt et al., 1999; Keeling, Luker & Palmer, 2000; Lee et al., 2010). Sie infizieren hauptsächlich Tiere wie Fische, Protisten, Krustentiere und Arthropoden, darunter viele Insekten (Keeling et al., 2000). Generell werden Wirte durch den Verzehr der Sporen oder deren Übertragung in die Eizelle infiziert. Bei Verzehr keimen sie auf einzigartige Weise: Ein innerhalb der Spore gewundener, filamentöser Schlauch (eng. polar tube/filament) wickelt sich schnell auf, punktiert die Mitteldarmzellen des Wirtes und injiziert den Sporenhalt in das Zellzytoplasma.

Microsporidia haben keine Mitochondrien und Golgi-Körper. Sie gewinnen Energie aus den Wirtszellen durch direkte Aufnahme von ATP (Adenosintriphosphat). Die Auswirkungen auf den Wirt sind typischerweise chronisch. In Bekämpfungsprogrammen werden sie durch ihre obligate intrazelluläre Lebensweise nur begrenzt eingesetzt (Keeling & Fast, 2002; Solter, Becnel & Oi, 2012). Detaillierte Beschreibungen zum Stamm der Microsporidia bieten Keeling und Fast (2002) oder Solter et al. (2012).

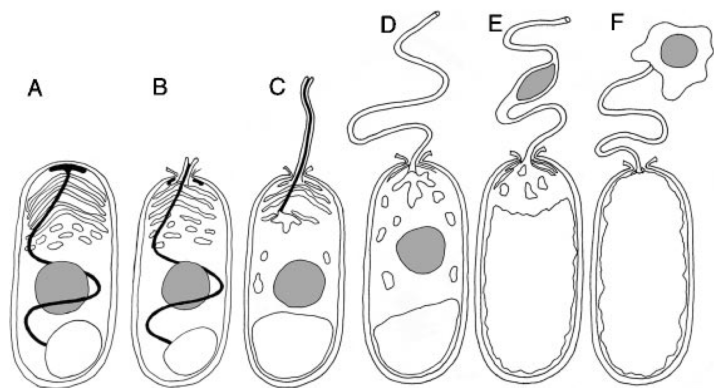


Abbildung 2: Aufwärtsdrehung des filamentösen Schlauches bei der Sporenkeimung. (A) Bildet die ruhende Spore ab: der filamentöse Schlauch (schwarz), der Nucleus (grau), Polaroplast und die hinten gelegene Vakuole. (B) Schwellung des Polaroplasts und der Vakuole, einschliesslich des Bruches der Verankerungsscheibe und dem beginnenden Austritt und der Aufwärtsdrehung des filamentösen Schlauchs. (C) Weiteres Aufdrehen des Schlauchs. (D, E) Bei vollständig umgestülpten Schlauch wird das Sporoplasma in und durch den Schlauch gedrückt. (F) Das Sporoplasma entweicht aus dem durch eine neue Membran gebundenen Schlauch. Aus Keeling und Fast (2002), unverändert.

### 3.1.3 Zoosporen ausbildende Pilze (eng. zoosporic fungi)

Alle Pilze, die während ihrem Lebenszyklus mindestens einmal begeißelte Sporen entwickeln, wurden früher in den Chytridiomycota gruppiert. Nach phylogenetischen Analysen wurden die Stämme Blastocladiomycota und Neocallimastigomycota von den Chytridiomycota abgetrennt. All diese Stämme zusammen bilden nun die Gruppe der Pilze, die Zoosporen ausbilden (Blackwell, 2010; Hibbett et al., 2007; James, Kauff et al., 2006; James, Letcher et al., 2006). Die Zoosporen dieser Pilzstämme sind mit einer einzigen, nach hinten ausgerichteter Geißel ausgestattet. Sie widerspiegelt den ans Wasser gebundene Lebenszyklus (Araújo & Hughes, 2016; James, Letcher et al., 2006). Die Zoosporen sind funktionell gleichwertig wie jene der Oomycota und sind Beispiel für konvergente Evolution (Araújo & Hughes, 2016). Die Mehrheit der zoosporenausbildenden Pilze sind an aquatische Lebensräume gebunden (Gleason et al., 2011). Die Wichtigkeit der Geißeln für das Überleben der Zoosporen in aquatischen Lebensräumen beschreiben Gleason und Lilje (2009).

Von den Chytridio-, Blastoclaio- und Neocallimastigomycota sind bei den ersten beiden Stämmen entomopathogene Arten bekannt. In den Chytridiomycota ist eine bedeutende Anzahl von Arten für die Parasitierung von Pflanzen, Tieren, Rädertierchen (Rotifera), Bärtierchen (Tardigrada), Protesten und anderen Pilzen bekannt. Vergleichsweise dazu parasitieren nur wenige Pilzarten Insekten (Araújo & Hughes, 2016). Die nun zu den Blastocladiomycota zugehörige Gattung *Coelomomyces* bildet mit über 70 beschriebenen, entomopathogenen Arten wohl die artenreichste dieser Pilzgruppe. Sie befallen vor allem ans Wasser gebundene Hemipteren und Dipteren (meist Mücken – Nematocera, (Goettel et al., 2005; Lucarotti, Federici & Chapman, 1985; Tahira, Saeed & Khan, 2014).

### 3.1.4 “Zygomycota” (eng. zygotic fungi)

Traditionell wurden die Zygomycota aufgrund ihrer oft nicht-septierten, mehrkernigen Hyphen und der Bildung von Zygosporien durch die Paarung zweier Gameten von anderen Pilzstämmen unterschieden (Humber, 2008). Molekularphylogenetische Analysen bestätigten aber die taxonomische Polyphyllie der Zygomycota, was zur Aufteilung in fünf monophyletische Taxa als Ersatz führte. Arten, die arbuskuläre Mykorrhiza-Verbindungen mit Pflanzen eingehen,

gehören nun zum Stamm der Glomeromycota (Schüssler, Schwarzott & Walker, 2001). Alle anderen Arten wurden auf die vier Substämme Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina, Mucoromycotina und Zoopagomycotina verteilt, ohne Unterbringung in einem eigenen Stamm (Hibbett et al., 2007; M. M. White et al., 2006).

Während Kickxellomycotina, Mucoromycotina und Zoopagomycotina hauptsächlich aus Saproben bestehen und nur wenige entomopathogene Arten bekannt sind, sind über 200 entomopathogene Arten den Entomophthoromycotina zugehörig (Araújo & Hughes, 2016; Humber, 2008; Mora, Castilho & Fraga, 2018; Lichtwardt, 2002). Sie produzieren Konidienträger mit positiv phototropem Wachstum. Ihre Sporen setzen sie in der Regel mit Druck frei. Viele Arten sind in der Lage aus den Primärkonidien Sekundärkonidien zu erzeugen. In einigen Fällen erfolgt die Infektion zwangsläufig über ein Sekundärkonidium. Diese Pilze sind in der Natur generell obligate Pathogene, die zur Zeit nur schwierig oder unmöglich auf künstlichen Medien zu kultivieren sind (Goettel et al., 2005; Humber, 2012b). Benny (2009), in der Literatur oft zitiert und empfohlen, bietet umfassende Informationen über die ehemals den Zygomycota zugehörigen Pilze.

### 3.1.5 Basidiomycota

Mit den Ascomycota bilden die Basidiomycota das Subreich Dikarya, zu dem die Mehrheit (ca. 98%) der beschriebenen Pilzarten gehört (Hibbett et al., 2007; James, Kauff et al., 2006). Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina und Agaricomycotina sind die drei Substämme der Basidiomycota. Pilz-Insekten-Interaktionen kommen in allen drei Substämmen vor. So fungieren einige Arten der Agaricomycotina als Lebensräume für verschiedene Insekten und andere wirbellose Tiere oder werden von Ameisen und Termiten kultiviert. Parasitismus ist aber nur in der Ordnung Septobasidiales (Substamm Pucciniomycotina) zu finden, die vor allem Schildläuse befallen. Die Pilze töten ihren Wirt selten, nutzen ihn aber als Nährstofflieferanten (Blackwell, 2010; Henk & Vilgalys, 2007; Humber, 2008).

### 3.1.6 Ascomycota

Der Stamm der Ascomycota ist mit über 64'000 beschriebenen Arten der Grösste im Reich der Pilze und zeichnet sich durch die Produktion von Meiosporen (Ascosporen) in spezialisierten sackförmigen Meiosporangien (Asci) aus. Diese wiederum können, müssen aber nicht zwingend, innerhalb eines Sporokarps (Ascoma: Fruchtkörper der Schlauchpilze) ausgebildet werden. Die Ascomycota werden in die drei Substämme Taphrinomycotina, Saccharomycotina und Pezizomycotina unterteilt (James, Kauff et al., 2006; F. E. Vega et al., 2012). Die Taphrinomycotina ernähren sich saprob oder sind Parasiten von Pflanzen oder Wirbeltieren (Hibbett et al., 2007). Viele Saccharomycotina, zu denen die «Bäckerhefe» gehört, haben enge Verbindungen zu Insekten entwickelt. So sind sie ernährungsphysiologisch für eine optimale Entwicklung der Insekten notwendig. Sie liefern Nährstoffe oder Vitamine, können sekundär schädigende Pflanzenstoffwechselprodukte entgiften oder Pheromone produzieren (James, Kauff et al., 2006; F. Vega & Dowd, 2005). Pezizomycotina ist der grösste Unterstamm der Ascomycota und umfasst die überwiegende Mehrheit der filamentösen, fruchtkörperproduzierenden Arten (James, Kauff et al., 2006). In dieser Pilzgruppe sind die wichtigsten Insektenpathogene zu finden. Dazu gehören Mitglieder der Ordnung Hypocreales, die nicht nur mit Arthropoden, sondern auch mit Pflanzen und anderen Pilzen interagieren (Blackwell, 2010). In den Hypocreales sind entomopathogene Arten aus über 40 Gattungen bekannt. Die wichtigsten kommen in *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Culicinusomyces*, *Gibellula*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Lecanicillium* (früher *Verticillium*), *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Isaria* (früher *Paecilomyces*), *Sorospora* und *Tolypocladium* vor (Goettel et al., 2005; Jaronski & Mascarin, 2016). Gute Übersichten zu den nach Faria und Wraight (2007) wichtigsten EPF, die in kommerzialisierten Produkten mehrheitlich Anwendung finden, sind für *Beauveria* in Zimmermann (2007a), für *Isaria* in Zimmermann (2008) und über *Metarhizium* in Zimmermann (2007b) nachzulesen. Jede dieser Referenzen enthält umfangreiche Informationen über die Biologie der jeweiligen Gattungen.

Zusammenfassend lassen sich EPF in zwei Kategorien einteilen. Die erste Gruppe setzt sich aus obligaten Parasiten zusammen, die zum Überleben zwingend einen geeigneten Wirtsorganismus benötigen. Ihre hohe Spezifität macht sie ideal für IPM-Programme. Die Massenproduktion ist aber durch die Notwendigkeit eines lebenden Wirtes erschwert (siehe Abschnitt 3.1.4 Zygomycota). EPF wie *Beauveria sp.*, *Isaria sp.* und *Metarhizium sp.* sind fakultative Saprophyten. Sie können in oder auf einem lebenden Organismus wachsen und sich fortpflanzen, besitzen aber im Gegensatz zu den obligaten Parasiten die Fähigkeit dies auf nicht-lebender Substanz zu tun. Dadurch können sie problemlos mit geringen Kosten und in grossen Mengen auf künstlichen Medien hergestellt werden. Sie sind daher besonders attraktiv für die Massenvermehrung (Skinner et al., 2014). Wie zuvor kurz beschrieben kann aber die mehrfache Subkultivierung bei der Massenvermehrung zum Verlust der Virulenz der Pilze führen (Butt et al., 2006). Um diese Problemstellung diskutieren zu können, muss der Infektionsprozess entomopathogener Pilze verstanden werden. Da die in dieser Arbeit verwendeten Pilze den Gattungen *Beauveria*, *Metarhizium* und *Isaria* angehören, werden sich die folgenden Kapitel hauptsächlich auf den Stamm der Ascomycota beziehen.



## 3.2 Infektionsprozess

Unter den entomopathogenen Organismen benötigen Viren, zahlreiche Bakterien und Nematoden für die Infektion des Wirtes spezifische Eintrittspfade wie die Mundöffnung oder Tracheen. Dem gegenüber stehen entomopathogene Pilze, die in der Lage sind, die Kutikula von Insekten zu durchdringen und so im Wesentlichen keine spezifische Eintrittsstelle für die Infektion benötigen. Diese Eigenschaft erlaubt es EPF Insekten im Eier- oder Puppenstadium zu infizieren. Favorisierte Infektionsstellen konnten aber zwischen den Mundwerkzeugen oder den Segmenten des Exoskeletts, sowie bei den Tracheen ausgemacht werden. An diesen Körperbereichen herrscht lokal höhere Luftfeuchtigkeit, was die Keimung der Sporen begünstigt und die Kutikula ist nicht sklerosiert (verhärtet), wodurch die Penetration des Gewebes erleichtert ist (Clarkson & Charnley, 1996; Hajek & St. Leger, 1994; Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013).

Während dem Infektionsprozess stellt der Wirt für den EPF die Hauptnahrungsquelle dar, um bei Abschluss der Infektion im geeignetsten Fall Fortpflanzungsstrukturen erzeugen zu können. Hier ist die Rolle des Wirtes passiv. Andererseits müssen Pilz und Wirt unter den richtigen Bedingungen aktiv aufeinandertreffen. Gelangt die Pilzspore an den Wirt, beginnt die Infektion mit (1) der Adhäsion der Spore an die Insektenkutikula, gefolgt von (2) der Keimung der Spore und (3) der Penetration der Kutikula. Adhäsion, Keimung und Penetration sind die drei essenziellen Etappen für eine erfolgreiche Infektion (Butt et al., 2016; Goettel et al., 2005; F. E. Vega et al., 2012).

(1) Wie beschrieben beginnt die Infektion durch den direkten Kontakt des Wirtes mit der Spore oder bereits infizierten Kadavern. Sie kann ebenso indirekt von luftübertragenen Sporen oder solchen, die sich in der Vegetation oder an Bodenpartikeln ablagern, verursacht werden (Hesketh et al., 2010). Die Mortalität des Wirtes steht in Abhängigkeit zur Menge der anhaftenden Sporen, weshalb eine gute Haftung der Sporen an der Kutikula von entscheidender Bedeutung ist (Butt & Goettel, 2000; Inglis, Enkerli & Goettel, 2012). Die infektiösen Sporen der meisten Taxa der Ascomycota haften durch unspezifische Adhäsionsmechanismen stark an der Kutikula des Insekts. Damit sind Interaktionen zwischen Proteinen auf der Sporenzellwand und der Oberfläche des Exoskeletts gemeint (Boucias, Pendland & Latge, 1988). Boucias et al. (1988) gebrauchten

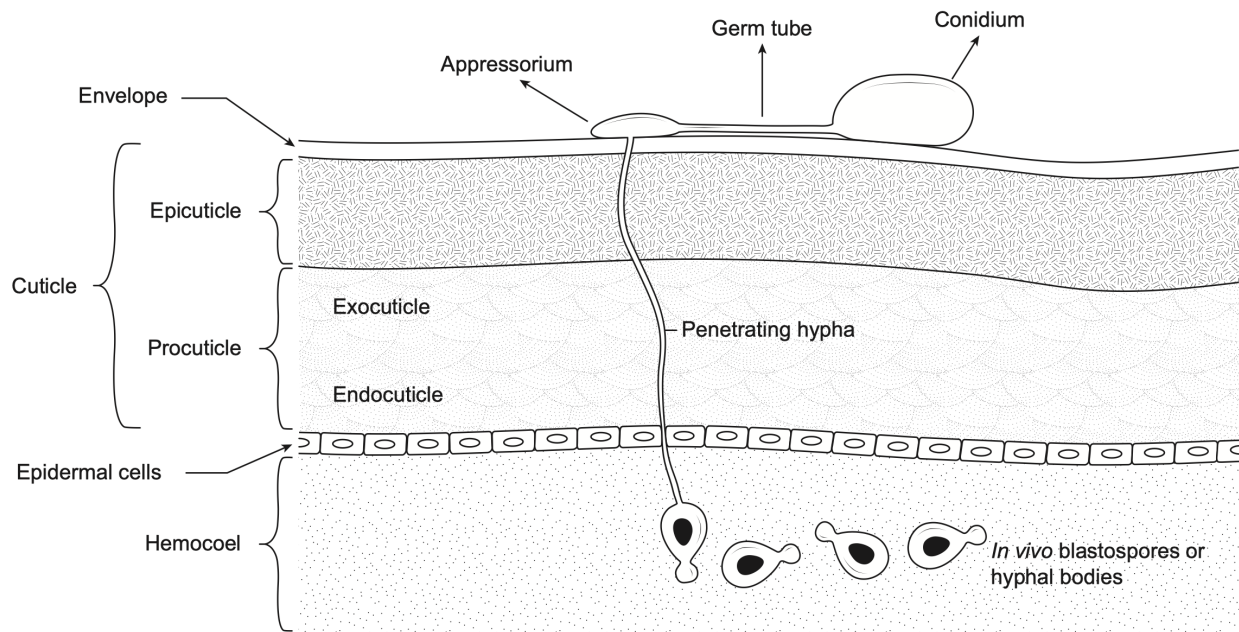


Abbildung 3: Generisches Modell, dass den Infektionsprozess entomopathogener Pilze zeigt. Eine infektiöse Spore haftet an der Kutikula eines Insekts. Sie bildet einen Keimschlauch (und Appressorium) aus, der mit einer Hyphe die Schichten der Kutikula durchdringt. Ist das Hämocoel erreicht bilden sich in vivo Blastosporen oder Hyphenkörper. Das Pilzwachstum setzt sich fort, dringt in Organe ein, stört Stoffwechselprozesse oder produziert toxische Metaboliten, die unter Umständen zum Tod des Wirtes führen können (aus F. E. Vega et al. (2012), unverändert).

statt Ascomycota die Bezeichnung Deuteromycetes, eine mit den Begriffen Deuteromycota, Hyphomycetes und *Fungi imperfecti* früher traditionell verwendete, heute verworfene Benennung. Die zu diesen Gruppen gehörenden Pilze erhielten eine Reklassifizierung in den Stamm der Ascomycota (F. E. Vega et al., 2012). Holder und Keyhani (2005) untersuchten die Haftung von Luftkonidien (eng. aerial conidia), untergetauchten Konidien (eng. submerged conidia) und Blastosporen von *B. bassiana* an hydrophoben und hydrophilen Oberflächen. Ihre Ergebnisse zeigen:

- Luftkonidien binden gut an hydrophobe Oberflächen, aber schwach an hydrophile Oberflächen;
- untergetauchte Konidien binden sich sowohl an hydrophobe als auch an hydrophile Oberflächen;
- *In vitro*-Blastosporen binden sich stark an hydrophile und schwach an hydrophobe Oberflächen.

So bleiben Luftkonidien von *Metarhizium*-Arten nicht an der Oberfläche von Mücken-Larven (z.B. *Aedes*, *Culex* und *Anopheles*) hängen, da die Adhäsionskräfte im Vergleich zu denen zwischen ihren Konidien und terrestrischen Wirten geringer sind. Das Nichtanhaften von Sporen an die Kutikula bestimmter Insektenarten kann dazu beitragen, die Spezifität von EPF's zu bestimmen (Greenfield et al., 2014; Holder & Keyhani, 2005).

(2) Das nächste kritische Ereignis nach der Anhaftung der Spore an die Kutikula ist die Keimung. Sie ist durch die Bildung einer Keimröhre mit oder ohne anschliessende Entwicklung eines Appresoriums definiert (F. E. Vega et al., 2012). Die Kutikula der Insekten ist für EPF eine unwirtliche Umgebung und die erste und grösste Hürde beim Infektionsprozess. Die Sporen der Pilze sind schädlichen UV-Strahlen, wechselhafter Feuchtigkeit und Temperatur, antagonistischen Mikroorganismen, der angeborenen Immunabwehr des Wirtes oder einem unzureichendem Nährstoffangebot auf der Kutikula des Wirtes ausgesetzt (Butt et al., 2016; Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2015; Smith & Grulla, 1981). Die epikutikuläre Wachsschicht des Wirtes (vgl. Abbildung 3, S. 21) besteht mehrheitlich aus Lipiden und ist dadurch eine signifikant hydrophobe Barriere. Vergleichbar mit der Exposition einer Spore gegenüber Sonnenlicht induziert sie osmotischen Stress (Hadley, 1981; Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2015). Die beschriebenen abiotischen und biotischen Begebenheiten auf der Wirtsoberfläche beeinflussen dementsprechend sowohl die Differenzierung als auch die Spezifität der Infektionsstrukturen (St. Leger, Butt, Staples & Roberts, 1989; St. Leger, Butt, Goettel et al., 1989). Insgesamt veranschaulicht dies die Komplexität der Wechselwirkungen und deuten darauf hin, dass eine Infektion in verschiedenen Stadien blockiert werden kann. Die Keimung selbst hat also nicht automatisch die Penetration der Kutikula zur Folge (Butt et al., 2016; Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2015). Einfaches Häuten des Wirtes genügt oft, um eine Infektion zu verhindern (Kim & Roberts, 2012). In den meisten Fällen aber ist eine genügend hohe Luftfeuchtigkeit ( $RH > 90\%$ ) in den Mikrohabitaten auf der Wirtskutikula für eine erfolgreiche Keimung und anschliessende Penetration ausschlaggebend. Die Temperatur dagegen beeinflusst die Geschwindigkeit der Keimung, des Wachstums und die Abtötung des Wirtes (Arthurs & Thomas, 2001; Hallsworth & Magan, 1995; Inglis et al., 2001; Luz & Fargues, 1997;

Meyling & Pell, 2006). Die optimale Temperatur für Keimung und Wachstum der in dieser Arbeit verwendeten Pilze liegt im Allgemeinen zwischen 20-30 °C (Dimbi et al., 2004; Hallsworth & Magan, 1999; Inglis et al., 2012; Ouedraogo et al., 1997; Smits et al., 2003; Tefera & Pringle, 2003).

(3) Hauptbestandteile der Insektenkutikula sind verschiedene Proteine, Lipide und Chitin (Clarkson & Charnley, 1996). Ascomycoza nutzen für die Penetration der Kutikula eine Kombination aus enzymatischen und mechanischen Mechanismen (Inglis et al., 2001). EPF wie *M. anisopliae* oder *B. bassiana* hydrolysieren die Bestandteile der Kutikula mit einem extrazellulären, enzymatischen Cocktail der aus Lipasen, Proteasen, Chitinasen, Phospholipase C und Katalasen besteht. Jedoch ermöglicht erst die Ausübung von mechanischen Druck die Durchdringung der Kutikula, um damit Zugang zur nährstoffreichen Hämolymphe zu erhalten (Joshi et al., 1995; Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013; St. Leger et al., 1992). Viele der produzierten Enzyme haben grosse Ähnlichkeit zu toxischen Bestandteilen in Bakterien- oder Tiergiften mit schädlichen Auswirkungen auf einen spezifischen Zielorganismus. Sie sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Faktoren, die die Virulenz von EPF beeinflussen (Cito et al., 2016; Santi et al., 2010; Screen & St. Leger, 2000). Dies ergänzend konnte die Wichtigkeit dieser Enzyme mit «Gen-Knockout»-Studien oder Enzymmutanten verifiziert werden. Genetisch modifizierte EPF, die übermässig Proteasen oder Chitinasen produzieren, zeigen eine erhöhte Virulenz im Vergleich zu ihrem Wild-Typ (Fan et al., 2007; St. Leger et al., 1996; Zhang et al., 2008).

Sobald die Kutikula durchbrochen ist, dringen die Hyphen in das Hämocoel des Wirtes ein und bilden ein- oder mehrzellige Morphotypen (Protoplasten, Blastosporen oder Hyphenkörper) aus. Artspezifisch sind diese Zellen in der Lage, phygozytischen Hämocyten zu umgehen oder in ihnen zu überleben. Ein Phänomen, das bei verschiedenen Tierpathogenen beobachtet werden konnte (Lewis, Robalino & Keyhani, 2009; Lovett & St. Leger, 2018; Wanchoo, Lewis & Keyhani, 2009). Die in der Praxis häufig eingesetzten Pilze *M. anisopliae* und *B. bassiana* überleben Verkapselungen im Hämocoel. Bidochka et al. (2010) vermuten, dass diese Anpassung eine Folge der fakultativ saproben Lebensweise im Boden ist, um Verkapselungen durch Bodenamöben zu überleben. Die Morphotypen der Hyphen nutzen anschliessend die verfügbaren Nährstoffe für

Wachstum und Vermehrung. Dabei schädigen sie das Gewebe unter anderem physisch und stören so die Physiologie des Wirtes. Die Pilze töten dabei häufig den Wirt. Andere EPF weisen spärliches vegetatives Wachstum auf und töten ihre Wirte durch die Produktion von sekundären Metaboliten. Oft aber ist eine Kombination aus Pilztoxinen, der physischen Behinderung der Durchblutung, dem Nährstoffverbrauch und die Schädigung der Organe für den Tod des Wirtes verantwortlich. Bei entsprechenden Bedingungen treten die Hyphen schließlich aus dem Inneren des Insekts aus und sporulieren, worauf der Infektionsprozess von neuem beginnt. Bei ungünstigen, sprich trockenen oder kühlen Umweltbedingungen, bleiben die Insektenkadaver häufig als pilzinfizierte Mumien intakt. Durch die Langlebigkeit der Insekten-Mumien gehören Ascomycota zu den am häufigsten anzutreffenden EPF (Clarkson & Charnley, 1996; Inglis et al., 2012; Lovett & St. Leger, 2017; Shahid et al., 2012; F. E. Vega et al., 2012).

### **3.3 Abwehrreaktionen des Wirtes**

Ungeachtet dessen, ob die Kutikula durch Raubtiere, Krankheitserreger, Parasiten oder Pflanzenfresser beeinträchtigt wird, wird neben der Immunabwehr eine hämostatische Reaktion eingeleitet. Die Verhinderung des Hämolympfenverlustes ist für das Überleben der Insekten unerlässlich (Dubovskiy et al., 2013; Theopold et al., 2002). Sobald aber ein EPF die Hämolymphe des Wirtes erreicht hat, kann eine Reihe von Abwehrreaktionen ausgelöst werden. Mehrzellige Tiere schützen sich gegenüber infektiösen Organismen bekanntermassen durch eine angeborene und/oder erworbene Immunkompetenz (Fearon, 1997). Insekten fehlt die Möglichkeit adaptive Antikörper auszubilden, besitzen aber eine gut entwickelte angeborene Immunantwort (Lemaitre & Hoffmann, 2007).

Zu den ersten Abwehrmechanismen des Wirtes gehören die physischen Barrieren des Integuments (Gesamtheit der äusseren Körperhülle) oder Darms, Gerinnungsreaktionen der Hämolymphe und die Produktion zytotoxischer Moleküle an der Wundstelle. Fremdkörper, die diese Barrieren überwinden und in das Hämoel eindringen, müssen weitere zytotoxischen Stoffe, sowie einer Reihe von verschiedenen Hämozyten überstehen (Lavine & Strand, 2002). Das Immunsystem der Insekten wird in diesem Sinne in humorale (die Körperflüssigkeit betreffend) und zelluläre Abwehrreaktionen unterteilt. Die Produktion antimi-

krobieller Peptide (Lemaitre & Hoffmann, 2007), reaktive Zwischenprodukte von Sauerstoff oder Stickstoff (Bogdan, Röllinghoff & Diefenbach, 2000) und die komplexen enzymatischen Kaskaden, die die Gerinnung oder Melanisierung der Hämolymphe regulieren (Theopold et al., 2002), gehören zu den humoralen Abwehrmechanismen. Zu den zellulären Abwehrreaktionen werden Phygozytosen, Nodulationen (Knöllchenbildung) und Verkapselungen gezählt (Lavine & Strand, 2002). Das Gelingen einer Infektion steht also in starker Abhängigkeit zum genetischen Potential des Pathogens schnell zu wachsen, wirtsinduzierte Barrieren zu überwinden und toxischen Chemikalien zu widerstehen (Hajek & St. Leger, 1994).

### **Abwehrreaktionen von *Galleria mellonella* gegenüber EPF**

Larven der Grossen Wachsmotte (*Galleria mellonella*) reagieren sehr empfindlich gegenüber allen Arten von Virulenz und werden in wissenschaftlichen Studien oft als Modellorganismus eingesetzt (Binder, Maurer & Lass-Flörl, 2016; Butt et al., 2006; Kavanagh & Fallon, 2010; Zimmermann, 1986). Sie sind preiswert in der Anschaffung, einfach zu halten und wurden wegen ihren aktiven zellulären und humoralen Reaktionen gegen Pilzinfektionen in der vorliegenden Arbeit als Wirtsorganismus gewählt. Experimente mit *G. mellonella* ermöglichen ausserdem eine effiziente Datenerhebung, die in der Regel innerhalb von ein bis zwei Wochen abgeschlossen werden kann (Binder et al., 2016; Boguś et al., 2007). Boguś et al. (2007) liefern ausführliche Analysen zu den zellulären und humoralen Abwehrreaktionen von *G. mellonella*. Begründet durch die in dieser Arbeit rein visuelle Mortalitäts-Kontrolle (siehe Kapitel 5.3.2 Durchführung Mortalitätsanalyse) werden hier allein die effektiv sichtbaren Abwehrreaktionen beschrieben.

Boguś et al. (2007) und Fuguet und Vey (2004) weisen auf sich bildende schwarze Punkte / schwärzende Flächen auf der Insektenkutikula während einer Pilzinfektion hin. Querschnitte infizierter *G. mellonella*-Larven zeigen an der Penetrationsstelle der Kutikula Kallusbildungen mit zunehmender Melanisierung der Epidermiszellen. Zusammen mit Hämocyten, die sich unter der Infektionsstelle ansammeln, bilden sie um den Pilzerreger melanitische Kapseln. Dieses Anzeichen ist in der Regel das offensichtlichste und früheste für die Entwicklung einer Mykose (vgl Tabelle 4, S. 37). Wichtig zu erwähnen ist, dass nicht jede Infekti-

on eine Melanisierung der Insektenkukikula verursacht. Im späteren Verlauf der Infektion ist das subletale Stadium der Larven durch extrem begrenzte Bewegungen gekennzeichnet. Dennoch sollten während der fortschreitenden Mykose keine Lähmungen hervorgerufen werden. Dies vereinfacht die Unterscheidung zwischen noch lebenden und bereits toten Insekten auch bei stark ausgeweiteter Infektion. Ebenso kann der Austritt klebriger Analexudate während dem Fortschreiten der Infektion festgestellt werden (Boguś et al., 2007; Fuguet & Vey, 2004).

Nachdem der verallgemeinerte Infektionsprozess von entomopathogenen Pilzen, sowie mögliche Abwehrreaktionen von Wirtsinsekten kurz beschrieben wurde, widmet sich das folgende Kapitel den Schwierigkeiten, die von der abnehmenden Virulenz bei serieller Subkultivierung ausgeht. Zusätzlich wird die Durchführung von Mortalitätsanalysen und dabei entstehende Probleme für den Vergleich solcher Studien beschrieben.

## 4 Mortalitätsanalysen mit entomopathogenen Pilzen

### 4.1 Die Komplexität der abnehmenden Virulenz entomopathogener Pilze (*in vitro*)

Die Virulenz entomopathogener Pilze ist wesentlich für den Erfolg eines biologischen Bekämpfungsmittels entscheidend. Ihre Konstanz ist bei der Herstellung von Produkten oder vergleichenden Bioassays von grosser Bedeutung. Besonders wichtig ist dies für kommerzialisierte Stämme, die vor ihrer Veredelung für das eigentliche Produkt mehrere Konidium-zu-Konidium-Zyklen durchlaufen. Die häufig beobachtbare Abnahme der Virulenz durch serielle Subkultivierung hat offensichtliche Auswirkungen auf die Qualität des Produkts, wodurch ihre Aufrechterhaltung während des gesamten Produktionsprozesses unerlässlich ist. Zu dem kommt die Problematik, dass Isolate oft auf der Grundlage von Bioassays unter optimalen Bedingungen (z.B. hohe Luftfeuchtigkeit, konstante Temperatur und Photoperiode) ausgewählt werden. Diese entsprechen aber nicht den eigentlichen Feldbedingungen. Aus diesem Grund sollte die Stabilität der Pilzstämme bezüglich Virulenz, Sporenbildung oder morphologischen Änderungen in der Massenproduktion und in Bioassays stets überprüft werden (Brownbridge et al., 2001; Charnley & Collins, 2007; Vandenberg & Cantone, 2004). Humber (2012a) betont wiederholt die Unvorhersehbarkeit, ob oder wann eines der lebenswichtigen Merkmale wie Virulenz und/oder Sporulation verloren gehen könnten und liefert ausführliche Informationen über die Konservierung entomopathogener Pilze. Der Verlust der Virulenz in der Massenproduktion oder bei Studien, die eine serielle Subkultivierung beinhalten, könnte durch die Beschränkung der Pilze auf rein saprobe Nahrungsaufnahme zurückzuführen sein. Die einfache Gewinnung von Nährstoffen aus den künstlichen Medien veranlasst die Pilze ihre pathogenitätsbezogenen Gene abzuschalten und ihren Metabolismus auf die Energiegewinnung aus den vorhandenen, simpleren Kohlenstoffstrukturen auszurichten (S. Safavi, 2012; Butt et al., 2006).

#### 4.1.1 Die Schwierigkeit klarer Gen-Effekt-Deklarationen

Die Abschwächung der Virulenz entomopathogener Pilze konnte in vielen Studien nachgewiesen werden (Nahar et al., 2008; S. Safavi, 2012; F. A. Shah et



al., 2007), ist aber keine zwingende Konsequenz bei serieller Subkultivierung (Ansari & Butt, 2011; Brownbridge et al., 2001; Vandenberg & Cantone, 2004). Wie diese Studien zeigen, ist die Abnahme und/oder der Verlust der Virulenz stammesabhängig. Mittlerweile konnten umfangreiche Erkenntnisse über Gene, die die Virulenz beeinflussen, gewonnen werden. Dennoch ist nur wenig darüber bekannt, welche Eigenschaften der Pilze sich genau bei einem Rückgang der Virulenz ändern. Gründe dafür könnte die unzureichende Unterscheidung zwischen Genen, die an der entomopathogenen Virulenz und Genen, die an allgemeinen biologischen Prozessen beteiligt sind, sein (Valero-Jiménez et al., 2016). Ortiz-Urquiza und Keyhani (2016) verdeutlichen hierzu eine weitere Problematik. In ihrem Review «*Molecular Genetics of Beauveria bassiana Infection of Insects*» werden 32 Gene beschreiben, die die Ausbildung von Konidien, Stressreaktionen und die Virulenz, kurz die Pathogenität, beeinflussen. Nach Ansicht der Autoren sind nicht all diese Gene wesentliche Akteure in den genannten Prozessen. Nichtsdestotrotz haben kleine Störungen breite Auswirkungen auf die gesamte Zellphysiologie. Klare Gen-Effekt-Deklarationen sind dadurch erschwert. Lovett und St. Leger (2017, 2018) und Wang und Wang (2017) betonen weiter, dass durch die Bioinformatik und Gen-Sequenzierung grosse Fortschritte im Verständnis über die Mechanismen, die der Pathogenität bzw. Virulenz eines EPF's zu Grunde liegen, gemacht wurden. So sind zum Beispiel Vorgänge, die für die Erkennung des Wirtes und die Entgiftung schädlicher Komponenten auf der Insektenkutikula verantwortlich sind, nachvollziehbar. Ebenso kann die Umgehung der Immunantwort des Wirtes (vgl. Kapitel 3.3 Abwehrreaktionen des Wirtes) unter anderem mit einer Remodulierung der Sporenoberfläche mit schützenden Proteinen erklärt werden (Lovett & St. Leger, 2018, 2017; Wang & Wang, 2017). Handkehrum ist es seit über 20 Jahren möglich die Virulenz modifizierter EPF durch die Überexpremierung der endogenen, Kutikula zersetzenden Protease Pr1 zu steigern (St. Leger et al., 1996). Durch genetische Modifikationen kann ebenfalls die Resistenz gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen verbessert werden. Liao et al. (2014) modifizierten den EPF *M. robertsii*, der nach der genetischen Transformation das Hitzeschockprotein (eng. heat shock protein) Hsp25 überexprimierte und so nicht nur extreme Temperaturen überlebte, sondern auch Resistenz gegen oxidativen Stress und osmotische

Substanzen zeigte. Es ist also möglich, die Pathogenität einzelner EPF zu steigern. Diese Vorgänge und die darin involvierten Gene unterscheiden sich zum Teil stark bei den in dieser Arbeit untersuchten Pilze und sind in mancher Hinsicht noch nicht vollständig verstanden. Hier wird deshalb auf genauere Diskussion der die Virulenz beeinflussenden Mechanismen verzichtet. Die Berichte von Lovett und St. Leger (2017, 2018) und Wang und Wang (2017) klären über die Komplexität dieses Forschungsfeldes auf.

#### 4.1.2 Vergleichbarkeit von Studien

Eine weitere Problematik für eindeutige Aussagen ist die Vergleichbarkeit von Studien. Um die Virulenz zu prüfen, werden im Labor gewöhnlich Bioassays unter Optimalbedingungen durchgeführt. Die genaue Kulturgeschichte der verwendeten Isolate ist selten bekannt und stellen ein besonderes Problem bei Studien dieser Art dar (Butt & Goettel, 2000). Die erzeugten Laborbedingungen unterscheiden sich oft nur leicht in z.B. Temperatur und Feuchtigkeit, Wahl des Kulturmediums oder dem Pilz-Stamm und Kulturalter. Diese Faktoren haben aber grossen Einfluss auf die Qualität des Inokulums und beeinflussen somit die Virulenz und schlussendlich das Potential der untersuchten Pilze (Hallsworth & Magan, 1996; Jaronski, 2013). Gute Übersichten über Protokolle bei der Durchführung von Bioassays mit EPF sind in Butt und Goettel (2000), Hajek, Papierok und Eilenberg (2012) oder Inglis et al. (2012) zu finden.

Die Virulenz degenerierter EPF kann bei der Herstellung von Biopestiziden oder für die Durchführung von Studien durch die Infektion eines passenden Wirtes mit dem degenerierten Pilz und dessen erneuten Isolierung aus dem Kadaver gelegentlich wieder hergestellt werden (Butt & Goettel, 2000; Butt et al., 2006). Hierbei entsteht ein weiteres Problem. Es ist bekannt, dass Pilzstämme mit geringer Virulenz gegenüber einem bestimmten Insekt bei Reisolierung aus dessen Kadaver eine erhöhte Virulenz gegenüber dem eingesetzten Wirt aufweisen (F. A. Shah & Butt, 2005). Frazzon et al. (2000) konnten nachweisen, dass Isolate von *M. anisopliae* aus experimentell infizierten Rinderzecken (*Boophilus microplus*) eine höhere Virulenz aufwiesen, als jene, die auf Kulturmedien gehalten wurden. In der Diskussion über das Potential eines EPF ist also die Berücksichtigung der angewandten Methodik essentiell.

## 4.2 Bestimmung der Virulenz

Der Begriff Virulenz wurde in der Einleitung definiert. Für kritische Diskussion der Begriffe Virulenz und Pathogenität siehe Shapiro-Ilan et al. (2005) und Thomas und Elkinton (2004). Wie oben erwähnt, werden traditionell Bioassays für die Virulenzanalysen entomopathogener Organismen verwendet und üblicherweise in einem Menge-Wirkungs-Verhältnis ausgedrückt. Dafür eignen sich die Größen  $LD_{50}$  (eng. lethal dose),  $LC_{50}$  (eng. lethal concentration) oder  $LT_{50}$  (eng. lethal time), sprich die letale Dosis, Konzentration respektive Zeit, die benötigt wird, um 50% einer Population zu töten. Dabei wird mit Dosis eine exakte Menge (z.B. Konidien pro Insekt) ausgedrückt, während sich die Konzentration auf einen relativen Gehalt (z.B. durchschnittliche Anzahl Konidien pro Milliliter Suspension) bezieht (Marcus & Eaves, 2000; F. E. Vega et al., 2012). Die Sterblichkeit von Schädlingen durch Mikroben hängt neben der ausgesetzten Menge der Pathogene oft von der Zeit der Exposition gegenüber dem Pathogen ab. Ein typisches Experiment zur Untersuchung der Zeit-Mortalitäts-Beziehung wird üblicherweise mit einer Gruppe Schädlinge durchgeführt, die dem Pathogen ausgesetzt sind, wobei die Mortalität zu bestimmten Zeiten während des Experiments aufgezeichnet wird. Die Aktivität der Pathogene wird in Form des erhaltenen  $LT_{50}$  ausgedrückt (Marcus & Eaves, 2000). Butt und Goettel (2000) und Hajek et al. (2012) empfehlen die Bestimmung des  $LT_{50}$  für den Vergleich der Virulenz oder unterschiedlichen Behandlungen. Dabei werden die Daten üblicherweise mit Statistik-Programmen (z.B. R oder SAS) unter Anwendung einer Überlebenswahrscheinlichkeits-Analyse miteinander verglichen (siehe Kapitel 5.4 Statistische Auswertung).

## 4.3 Durchführung von Mortalitätsanalysen

Im Kapitel 4.1 Die Komplexität der abnehmenden Virulenz entomopathogener Pilze (*in vitro*) wurde bereits auf entstehende Probleme bei vergleichenden Bioassays eingegangen und umfangreiche Literatur für deren Durchführung vorgeschlagen. Infolgedessen werden hier nur kurz die wichtigsten Faktoren, die bei der Durchführung von Bioassays, spezifisch Mortalitätsanalysen, berücksichtigt werden müssen, vorgestellt. Hajek et al. (2012) fasst das Wichtigste wie folgt zusammen:

- Die Methodik sollte reproduzierbar sein und mehrfach wiederholt werden. D.h. mit verschiedenen Sätzen des Inokulums und an verschiedenen Tagen beginnend, um die Konsistenz der Ergebnisse zu dokumentieren.
- Die verwendeten Testinsekten sollten sich in einem standardisierten Zustand befinden. Damit sind Insekten im selben Stadium gemeint, die nicht von einem anderen Erreger infiziert sind. Ausser der zusätzliche Erreger ist Teil der Studie. Das Inokulum sollte ebenfalls Standardmerkmale für die Wiederholungen aufweisen.
- Die Methoden, Vorgehen und Bedingungen müssen während des gesamten Bioassays einheitlich sein.
- Das Mitführen einer Kontrollgruppe von Insekten, die nicht mit dem Erreger behandelt aber gleichen Bedingungen ausgesetzt werden, ist essentiell.

Mortalitätsanalysen werden in der Regel täglich durchgeführt. Aufgrund der langsamen Entwicklung der meisten entomopathogenen Hypocreales müssen Daten bis zu zwei Wochen oder länger nach der Impfung der Insekten mit dem Pathogen erhoben werden. Werden die Insekten nicht einzeln inkubiert, müssen die Kadaver der Insekten entfernt werden, um eine horizontale Übertragung zu verhindern. Demgemäss ist es wichtig zu wissen, ob ein Insekt an einer Mykose oder aus anderen Gründen verendete (siehe Kapitel 3.3 Abwehrreaktionen des Wirtes, S. 24). Zu guter Letzt darf die Mortalität der Kontrollgruppe nicht mehr als 10% betragen (Butt & Goettel, 2000; Inglis et al., 2012).

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Inokulation der Pilzkulturen

Die in dieser Arbeit untersuchten Pilze (*Beauveria sp.*, *Metarhizium sp.* und *Isaria sp.*) wurden in der Masterarbeit von Mustafa (2016) aus der Rhizosphäre von *Taraxacum officinale*, *Salvia pratensis*, *Bromus erectus*, *Trifolium pratense* oder *Dactylis glomerata* isoliert, Reinkulturen erstellt und molekular-biologisch bestimmt. Zusätzlich wurde ein vielversprechender *M. anisoplia*-Stamm der Forschungsanstalt Agroscope Schweiz auf seine entomopathogenen Eigenschaften untersucht (ersichtlich in Tabelle 2).

Tabelle 2: Informationen zu den untersuchten EPF. Erfasst in der Mykothek der ZHAW Wädenswil.

EPF	Mykothek-Nr.	ID	Stamm/Isolat	Fundort
<i>Beauveria bassiana</i>	6	MYKTH. 102	KJ489063	NA
	19	A9-W	KJ489063	Zizers (GR)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	74	NA	«Metarhizium Schweiz» (CM F1_21.04.16_5116	Agroscope (Hr. Giseler)
	125	F4Tr2	KT583222	Uri
<i>Metarhizium brunneum</i>	36	F1 Tr9	KVL13-06	Uri
	115	Tut.3 (B14E)	KVL113-02	Zizers (GR)
<i>Metarhizium robertsii</i>	40	F1 B3	KVL14-122	Uri
	75	Z S5	KVL14-122	Zizers (GR)
<i>Isaria fumosorosea</i>	138	VF3 Tx7	KT225594	Graubünden

Die Pilzisolat wurden seriell alle zwei Wochen auf neue Corn Steep-Agar-Platten (90mm Petri-Schalen; Formuliert nach Anhang A.1) transferiert und mit Parafilm verschlossen. Dies wurde bis hin zur zehnten Subkultur wiederholt. Die Subkulturen wurden in einem Klimaschrank bei 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% in Dunkelheit inkubiert. Dabei wurden von jeder Subkultur jeweils vier Replikate erstellt. Bei den Subkulturen 5. und 10., die mit der zweiten Subkultur für die Bestimmung der Virulenz und des Pilzwachstums verwendet wurden, wurden jeweils zehn Replikate erzeugt. Da für das Überprüfen und Erstellen von reinen Subkulturen keine genetische Bestimmung möglich war, wurden um allfällige Kontaminationen auszuschliessen die jeweils neusten Replikate visuell mit den originalen Kulturen oder mit mehreren älteren Subkulturen abgeglichen. Um die im Kapitel 1 Einleitung beschriebenen, möglichen morphologischen Veränderungen nachweisen zu können, wurde jede Subkultur im Alter von zwei Wochen fotografisch dokumentiert.

## 5.2 Messung des Pilzwachstums

Um das Pilzwachstum, respektive die erreichte Grösse nach zwei Wochen Wachstumszeit zu messen, wurde das digitale Planimeter (Planix5) verwendet. Das Planimeter wurde gemäss Gebrauchsanleitung auf einer schwarzen Holzplatte mit einem Loch für Petrischalen platziert. Um Messfehler zu verringern, wurde das Polgewicht mit Klebeband fixiert und die Petrischalen auf eine gut haftende Kunststoffolie gelegt (vgl. Abbildung 4). Durch die Färbung des Corn Steep-Agars konnte



Abbildung 4: Planimeter (*Planix5*) befestigt auf einer schwarzen Holzplatte mit einem Halterungsloch für 90mm Petrischalen.

Bild: A. Rutzer

der genaue Umriss der Pilze am Boden der Petrischale nur schwer ausgemacht werden. Daher wurden die Umrisse jeweils so genau wie möglich auf dem Deckel der Petrischale nachgezeichnet. Durch den Verschluss der Petrischalen mit Parafilm konnten Drehungen des Deckels und so entstehende Ungenauigkeiten beim Nachzeichnen verringert werden. Wichtig zur Kenntnisnahme: Beim Nachzeichnen des Umrisses auf dem Petrischalen-Deckel muss der Blick in einem möglichst senkrechten Winkel über den Stift auf die Wachstumsfläche fallen, um den Einfluss des Blickwinkels auf das Ergebnis zu minimieren! Der Startpunkt der Messung wurde mit einer Linie markiert. Vom Startpunkt ausgehend wurde dann die Pilzfläche mit dem Planimeter gemessen. Jede Messung wurde drei Mal wiederholt und deren Mittelwert notiert. Bei Fehlern oder operativen Ungenauigkeiten wurde der Messvorgang stets wiederholt. Bei der seriellen Subkultivierung musste festgestellt werden, dass sich aus einigen Pilzen Reinkulturen mit nur einem Wachstumszentrum erzeugen liessen. Bei anderen wiederum war dies praktisch unmöglich (vgl. Abbildung 5, unten). Für die Messung des Wachstums wurde daher die gesamtheitliche Fläche aller Wachstumszentren bestimmt. Kulturen mit Kontaminationen wurden von den Messungen ausgeschlossen.

### 5.3 Mortalitätstest zur Bestimmung der Virulenz mit *Galleria mellonella*-Larven (Grosse Wachsmotte)

Um eine mögliche Abnahme der Virulenz der untersuchten EPF zu bestimmen, wurden mit der 2., 5. und 10. Subkultur Mortalitätsanalysen durchgeführt. Die Versuche wurden an *Galleria mellonella*-Larven (Grosse Wachsmotte; Lepidoptera - Pyralidae) im letzten Stadium, die vor Eintritt in die Metamorphose ihre Nahrungsaufnahme einstellen, durchgeführt (Boguś et al., 2007). Die Insekten wurden im Tierladen «QUALIPET» Wädenswil (8820) und Dättwil (5403) bezogen. Bis zu ihrer Verwendung in den jeweiligen Mortalitätsanalysen wurden die Tiere in einem Kühlschrank (4 °C) gelagert. Ca. drei Stunden vor Beginn der Mortalitätsanalyse wurden die Insekten aus dem Kühlschrank entnommen. Durch die vorzeitige Entnahme konnten sich die Tiere an Raumtemperatur (ca. 23 °C) akklimatisieren.

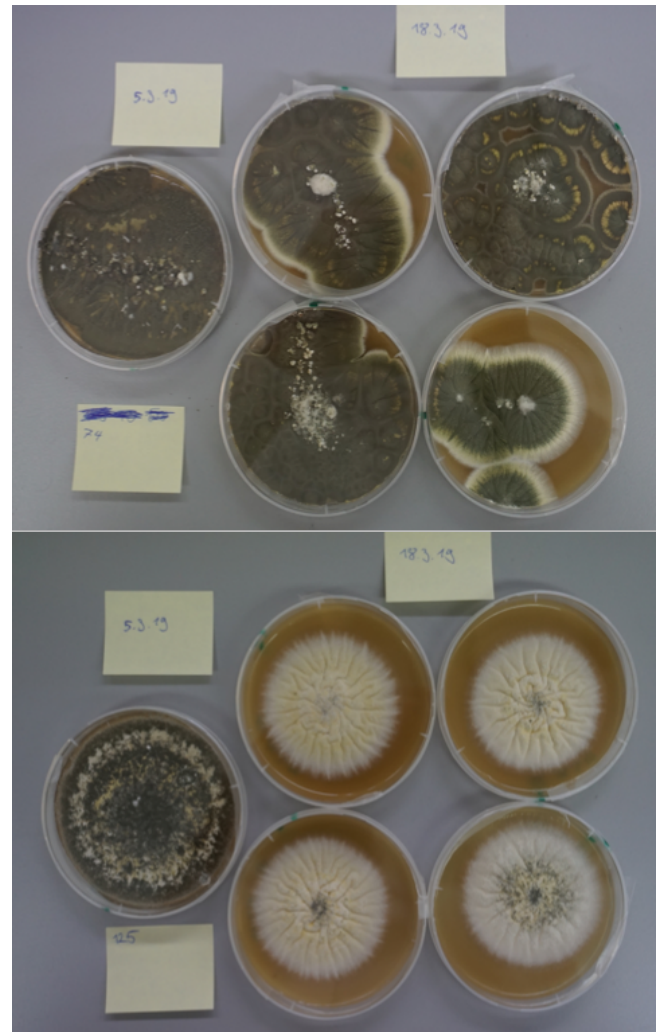


Abbildung 5: Unterschiedlicher Erfolg beim Erstellen reiner Subkulturen mit nur einem Wachstumszentrum. Hier abgebildet sind die beiden Pilzstämmen von *M. anisoliae* (oben: *Metarhizium* Schweiz - CM F1\_21.04.16\_5116 der Agroscope, unten: KT583222) nach fünfmaligem Subkultivieren.  
Bild: A. Rutzer

### 5.3.1 Herstellung der Sporen-Suspensionen

Für die Herstellung der Sporenlösung wurden fünf Wochenalte Kulturen verwendet. Das Alter der Kulturen wurde gewählt, da bei Auszählungen von zwei und drei Wochen alten Kulturen des verwendeten *I. fumosorosea*- und *M. robertsii*-Stammes (Mykothek Nummer 138 bzw. 75) eine ungenügend grosse Anzahl Sporen isoliert werden konnten. Für die Isolation wurden jeweils 20 mL autoklaviertes Reinstwasser in die Petrischale der zu untersuchenden Subkulturen pipettiert. Ein Glas-Objektträger wurde zur Sterilisation mit einem Ende in Ethanol (70%) eingetaucht und kurz abgeflammt. Mit dem stilisierten Ende des Objektträgers wurde vorsichtig und ohne Druck auszuüben die Sporen und das Myzel des Pilzes von dem Nährmedium abgelöst. Der Inhalt der Petrischale wurde durch Glaswolle in einem autoklavierten Glastrichter in eine ebenfalls autoklavierte 250 mL Schott-Flasche filtriert. Die Konzentration der erhaltenen Sporenlösung wurde mit einer «Improved Neubauer»-Zählkammer ermittelt und daraus die effektive Sporenkonzentration pro mL errechnet (siehe Anhang A.2). In Mortalitätsanalysen betreffende Studien wurden Sporenkonzentrationen von  $x \times 10^5$  bis  $x \times 10^9$  Sporen pro mL verwendet (Butt & Goettel, 2000; Erler & Ates, 2015; Mascarin et al., 2013; F. A. Shah et al., 2005; Vandenberg & Cantone, 2004). Eine Vielzahl der betrachteten Studien, sowie Mustafa (2016) benutzten eine Konzentration  $x \times 10^6$  Sporen pro mL für die Durchführung der Bioassays. Diese Konzentration wurde daher auch in dieser Arbeit verwendet. In Tabelle 3 sind die eingestellten Konzentrationen ersichtlich.

Tabelle 3: Eingestellte Konzentration der Sporenlösungen für den Mortalitätstest

EPF	Mykothek Nummer	Sporenkonzentration pro mL (alle Angaben: $x \times 10^6$ )		
		2. Subkultur	5. Subkultur	10. Subkultur
<i>B. bassiana</i>	6	2.4	1.28	1.73
	19	1.8	1.7	1.68
<i>M. anisopliae</i>	74	1.6	1.63	1.2
	125	1.73	1.93	1.45
<i>M. brunneum</i>	36	1.03	1.2	1.15
	115	1.23	2.18	1.55
<i>M. robertsii</i>	40	1.2	1.25	1.33
	75	1.68	1.65	1.78
<i>I. fumosorosea</i>	138	1.58	1.95	1.53



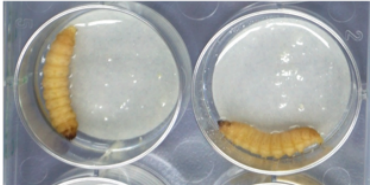

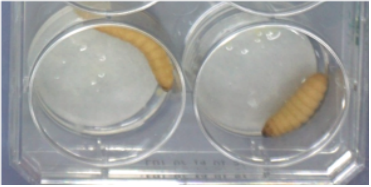

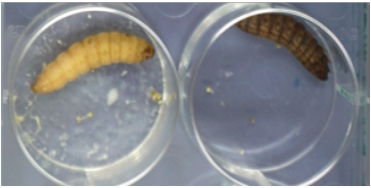


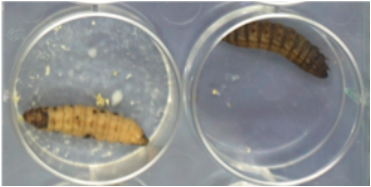
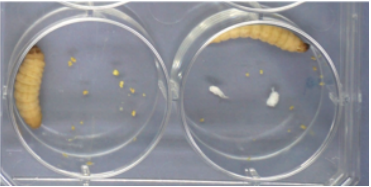


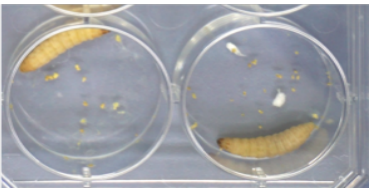


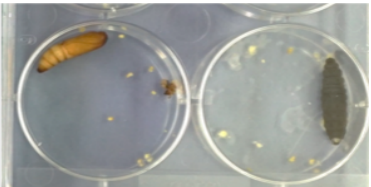
### 5.3.2 Durchführung Mortalitätsanalyse

Um die Lebensfähigkeit der Pilzsporen und der *Galleria*-Larven zu garantieren, wurde die Sporenlösungen am jeweiligen Versuchstag hergestellt und die Insekten nur wenige Tage (max. 4 Tage) vor der Mortalitätsanalyse bezogen. Für die Durchführung der Mortalitätsanalysen wurden Multiwell-Petrischalen (6 Kammern mit je 9.6 cm Fläche) verwendet. In jede Kammer wurde jeweils ein Filterpapier (Whatman<sup>®</sup>, 32 mm Durchmesser) und eine *Galleria*-Larve gelegt, bevor ein Milliliter der zuvor eingestellten Sporenlösungen gleichmässig über die Insekten pipettiert wurde. Pro Pilzstamm wurden zwölf Larven eingesetzt, insgesamt also 108 Larven pro Analyse einer Subkultur (exklusive Kontrollgruppe). Die Petrischalen mit Sporenlösung und Larven wurden in einem Klimaschrank bei 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% in Dunkelheit 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Larven in neue, trockene Sechsfach-Petrischalen ohne Filterpapier transferiert, um negative Auswirkungen der Feuchtigkeit auf die Insekten zu vermindern. Inklusive den ersten 24 Stunden, in denen die Insekten in der Sporenlösung lagen, wurde die Mortalität der Larven bei der 5. und 10. Subkultur täglich über zwölf Tage bestimmt und Veränderungen bezüglich Aussehen oder Vitalität notiert. Aus Ausbildungsgründen konnte die Mortalität der 2. Subkultur am 4., 6. und 8. Versuchstag nicht erfasst werden. Erst wenn der Tod aller sechs Larven einer Multiwell-Petrischale verzeichnet werden konnte, wurde die jeweilige Schale mit Parafilm verschlossen.

#### Tod verursacht durch Pilzinfektion?

Während den Versuchen konnte in einigen Fällen nur schwer abgeschätzt werden, ob ein Insekt an der Pilzinfektion oder auf eine andere Art und Weise verendete. Demzufolge wurden die Entwicklungen der Pilzinfektionen fotografisch festgehalten, um die Rückverfolgbarkeit der Resultate zu garantieren. In dieser Arbeit wurden Tode, die nicht klar einer Pilzinfektion zugeschrieben werden konnten, als «natürliche Tode» bezeichnet. In Tabelle 4 sind Infektionsverläufe der Pilze *B. bassiana* und *M. robertsii* abgebildet. Ergänzend ein Beispiel aus der Kontrollgruppe, in der ebenfalls ein «natürlicher Tod» dokumentiert werden musste. Die Bilder stammen aus der ersten Mortalitätsanalyse mit der zweiten Subkultur und sollen die Unterscheidbarkeit von Pilzinfektion und natürlichem Tod verdeutlichen.

Tabelle 4: Chronologische Abbildung der Infektionsvorgänge während der Mortalitätsanalyse der 2. Subkultur von *B. bassiana* (Mykothek-Nr. 19) und *M. robertsii* (Mykothek-Nr. 75), in den Bildern jeweils links abgebildet. Dem gegenüber sind auf der rechten Hälfte aller Bilder Beispiele für den Verlauf eines «natürlich» eintretenden Todes abgelichtet.

Tag	<i>B. bassiana</i>	<i>M. robertsii</i>	Kontrolle
1			
3			
5			
7			
12			

## 5.4 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mithilfe von Microsoft Excel 2019 für Macintosh verwaltet. Zur statistischen Analyse wurde R (Version 3.6.1) in Kombination mit RStudio (Version 1.2.1335) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 5\%$  festgelegt. Die Resultate der Wachstumsflächen wurden mithilfe von Boxplots visualisiert (Standardimplementierung in R, Version 3.6.1). Bei Boxplots bezeichnen die Ränder der Box das 25% und das 75% Quantil, die Linie darin das 50% Quantil. Um Veränderungen der Wachstumsflächen bestimmen zu können, wurden Regressionsanalysen durchgeführt. Dabei war die Nullhypothese, dass sich die erhaltene Steigung der Regressionsanalyse nicht signifikant von Null unterscheidet. Die angegebenen P-Werte beziehen sich auf die durchgeführte Regressionsanalyse. Um zu untersuchen, ob Veränderungen in Morphologie oder

im Wachstum auf Zufall basieren, wurde der Exakte Fisher-Test angewandt. Die Nullhypothesen waren hier einerseits, dass es keine morphologischen Veränderungen gibt und andererseits die Wachstumsrate der Pilze konstant bleibt. Der Exakte Fisher-Test wurde unter der Annahme durchgeführt, dass die 2. Subkultur die Kontrollgruppe ohne Veränderung in Morphologie oder Wachstum darstellt. Zur Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeit der *Galleria*-Larven an einem bestimmten Zeitpunkt nach der Infektion, sowie zur Abschätzung der mittleren Todeszeit ( $LT_{50}$ , die Zeit nachdem 50% der behandelten Insekten verendeten) wurde das Kaplan-Meier-Modell angewandt (R-Package: «survminer»). Dieses Modell berücksichtigt s.g. zensierte Daten, also Insekten, die durch das Eintreten eines natürlichen Todes ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr in die Berechnung miteinfließen. Um die Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen zwei oder mehreren Gruppen zu vergleichen, sprich die Resultate der 2., 5. und 10. Subkultur, wurde der log-rank-Test angewandt, der den gesamten Beobachtungszeitraum berücksichtigt (Bland & Altman, 2004). Die Nullhypothese des log-rank-Tests geht davon aus, dass es keinen Unterschied zwischen untersuchten Populationen in der Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses (hier der Tod einer Larve) zu jedem Zeitpunkt gibt. Der Test basiert auf den gleichen Annahmen wie die Kaplan-Meier-Methode (Jager et al., 2008). Die geschätzten  $LT_{50}$ -Werte entsprechen dem Median der Überlebenswahrscheinlichkeit. Die abgebildeten Konfidenzintervalle entsprechen ihrem 95% Vertrauensbereich (95% CI). Statistische Grafiken wurden mit dem Programm RStudio erzeugt.

## 6 Resultate

### 6.1 Morphologische Veränderungen der Pilzkulturen



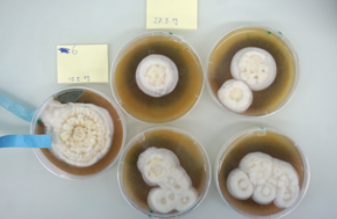
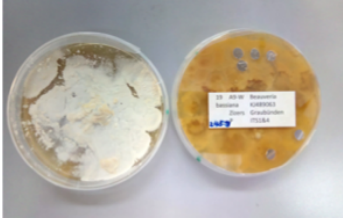




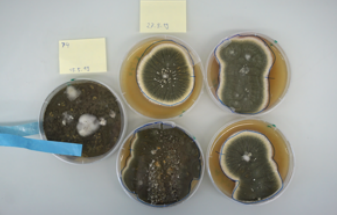

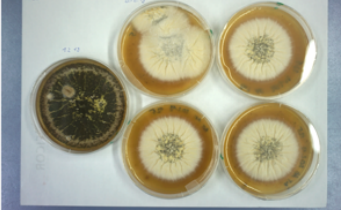
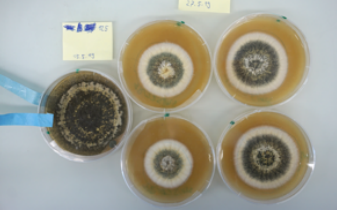

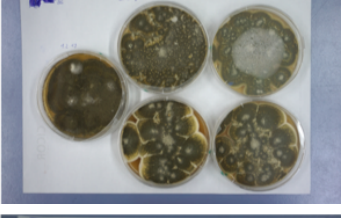
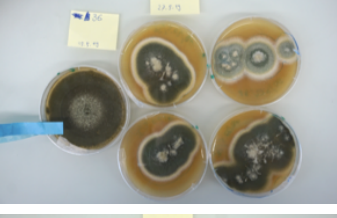


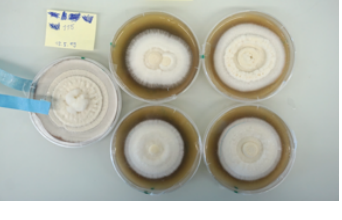
Dieses Kapitel bezieht sich auf rein visuelle Beobachtungen. Die hier verwendeten Ausdrücke könnten abhängig vom jeweiligen Leser unterschiedlich interpretiert werden. Die beschriebenen Veränderungen können in Tabelle 5 nachvollzogen werden.

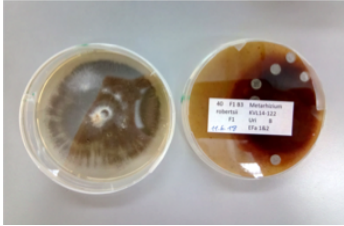
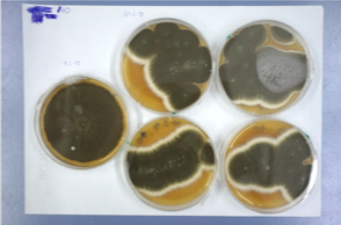
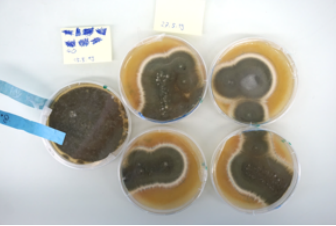


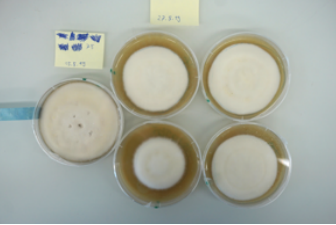
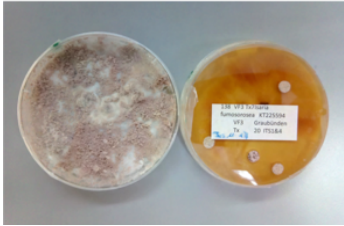
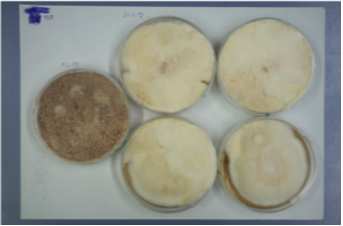
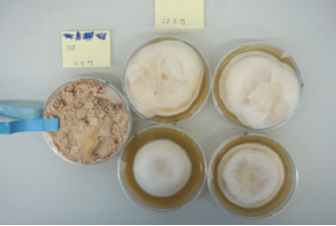
Beide *B. bassiana*-Stämme (Mykothek-Nr. 6 und 19) behielten ihr eher flaumiges Aussehen. Bei Stamm 6 verkörperte sich, dass zu Beginn konzentrisch wachsende, flaumige Myzel bei der 10. Subkultur an teils Stellen eingefallener. Beide Pilzstämme entwickelten eine im Vergleich zu der 2. Subkultur, die gelblich schien, leicht rötliche Farbe. Bei den *M. anisopliae*-Stämmen konnten keine visuellen Veränderungen festgestellt werden. Unter Berücksichtigung des Fundortes (Nr. 36 in Uri und Nr. 115 in Zizers) kann *M. brunneum* als gutes Beispiel für sich stark unterscheidende Phänotypen auf Stammesebene betrachtet werden. Bei Stamm 36 konnten abgesehen von einer sichtbar reduzierten Wachstumsrate keine phänotypischen Veränderungen wahrgenommen werden. Gut sichtbar war hier die sich bildende, weisse Wachstumsstruktur, die von der Inokulationsstelle des Pilzes im Nährmedium ausging. Diese Struktur konnte bei allen hier untersuchten, grün-wachsenden *Metarhizium*-Arten mehr oder weniger festgestellt werden. Das Wachstum des *M. brunneum* Stammes mit der Mykothek-Nr. 115 war vergleichbar mit den *B. bassiana*-Arten. Das anfangs flaumige Wachstum erschien bei der 10. Subkultur eingefallener und rötlicher. Dadurch war bei der 10. Subkultur die Animpfstelle der Pilze deutlich erkennbar. *M. robertsii* kann als gutes Beispiel für unterschiedliche Ausprägungen des Phänotyps betrachtet werden. Analog zu den *M. brunneum*-Arten wurden die grün erscheinenden Pilzstämme in Uri und die weissen in Zizers isoliert. Bei *M. robertsii* Nummer 40 konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Die Wachstumszentren der Mykothek-Nr. 75 waren bei der 2. Subkultur durch leichtes Einfallen und Tröpfchenbildung des Myzels teils besser erkennbar als bei der letzten Subkultur. Die ebenfalls flaumige Wachstumsart von *I. fumosorosea* erschien nach der 10. Subkultur in ähnlicher Weise degeneriert wie jene von *M. brunneum* (Nr. 115) oder *B. bassiana* (Nr. 6). Somit konnte bei sechs



von neun Pilzen sichtbare morphologische Veränderungen festgestellt werden. Diese Veränderungen sind aber nicht statistisch signifikant ( $p = 0.05185$ ).

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung für den Vergleich der Morphologie der 2. und 10. Subkultur. Die Kulturen waren bei den Fotoaufnahmen zwei Wochen alt. Um allfällige Veränderungen besser nachvollziehen zu können wurden in der linken Spalte die Original-Kulturen abgebildet. In dieser Spalte sind Original-Kulturen auf dem Petrischalen-Deckel, in den jeweiligen Bildern rechts. Auf der linken Seite dieser Bilder ist die 1. Subkultur im Alter von vier Wochen abgebildet. Bilder: A. Rutzer.

EPF (Nr.)	Originale	2. Subkultur	10. Subkultur
<i>Beauveria bassiana</i> (6)			
<i>Beauveria bassiana</i> (19)			
<i>Metarhizium anisopliae</i> (74)			
<i>Metarhizium anisopliae</i> (125)			
<i>Metarhizium brunneum</i> (36)			
<i>Metarhizium brunneum</i> (115)			

EPF (Nr.)	Originale	2. Subkultur	10. Subkultur
<i>Metarhizium robertsii</i> (40)			
<i>Metarhizium robertsii</i> (75)			
<i>Isaria fumosorosea</i> (138)			

## 6.2 Flächenveränderung im Pilzwachstum

Die Wachstumsrate (Messzeitpunkt nach zwei Wochen Inkubationszeit) der *B. bassiana*-Stämme nahm nicht signifikant ab. Bei *M. anisopliae* nahm nur jene von dem Stamm mit der Mykothek-Nr. 125 ab, diese aber stark ( $p = 0.0000201$ ). Mit ähnlicher Signifikanz ( $p = 0.0001928$ ) reduzierte sich die Wachstumsrate des *M. brunneum*-Stammes mit der Mykothek-Nr. 36. Ebenso nahm die Wachstumsrate des *M. robertsii*-Stammes Nr. 75 ( $p = 0.0211$ ) und des EPF *I. fumosorosea* (Nr. 138,  $p = 0.000742$ ) signifikant ab. So reduzierte sich die Wachstumsrate von insgesamt vier der neun untersuchten Pilzstämme signifikant. Diese Reduktion darf mit einem p-Wert von 0.115 aber nicht verallgemeinert werden.

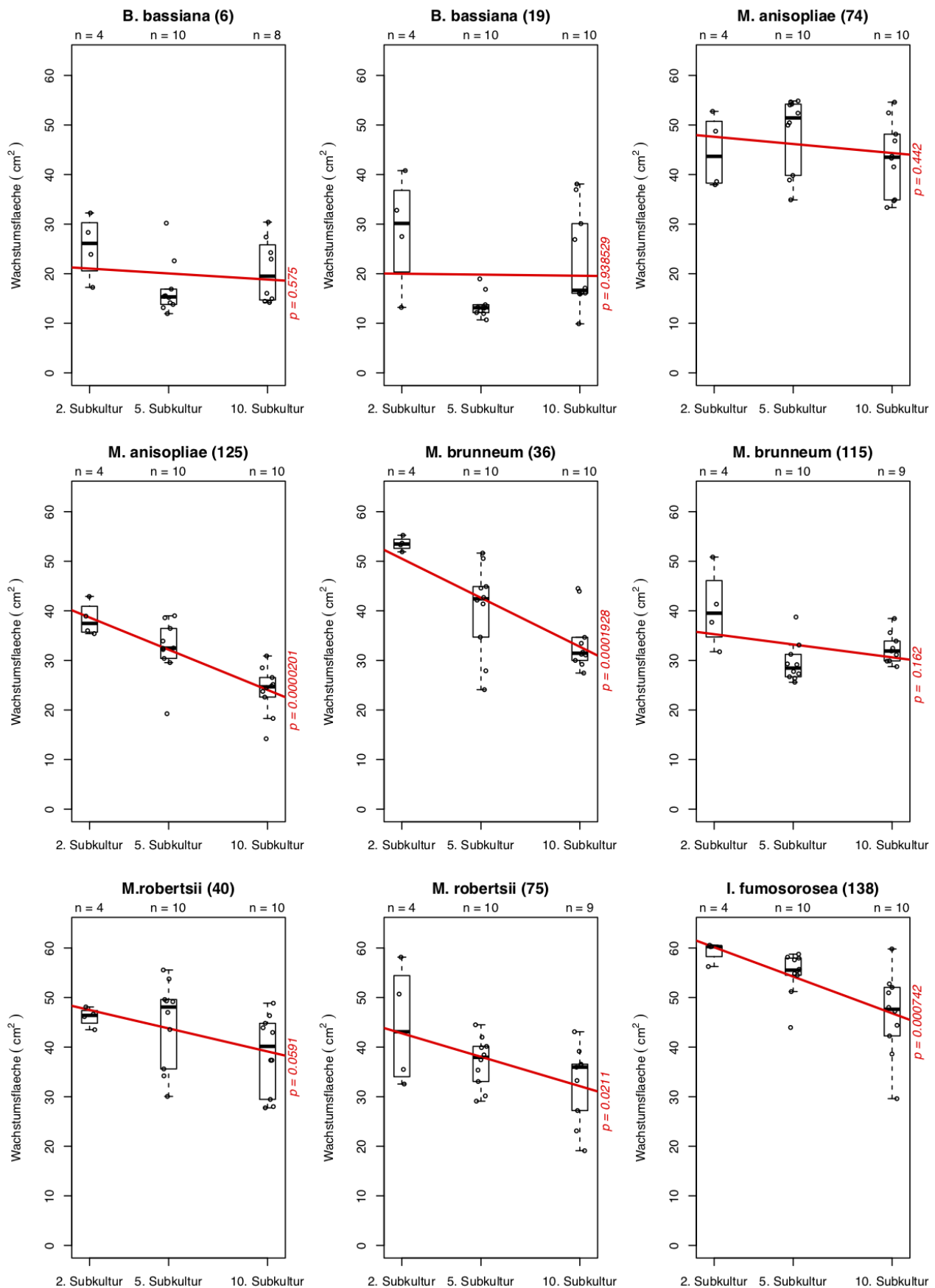


Abbildung 6: Veränderungen der Wachstumsflächen mit Boxplots visualisiert. In Rot dargestellt, ist die jeweilige Regressionsanalyse mit zugehörigem P-Wert (links der Graphiken). Die Variable  $n$  beschreibt die Anzahl Wiederholungen. Die in Klammern gesetzte Nummern entsprechen der Mykothek-Nummer der ZHAW Wädenswil (vgl. Tabelle 2, S. 32).

## 6.3 Mortalitätstest zur Bestimmung der Virulenz mit *Galleria mellonella*-Larven (Grosse Wachsmotte)

### 6.3.1 Anzahl isolierter Sporen

Die in Tabelle 6 abgebildeten Sporenkonzentration konnten vor der Verdünnung auf  $x \times 10^6$  Sporen pro mL von den jeweiligen Kulturplatten gewonnen werden. Diese Angaben werden hier als Erfahrungswerte für zukünftige Untersuchungen abgebildet und wurden nicht weiter ausgewertet.

Tabelle 6: Anzahl isolierter Sporen vor dem Einstellen auf eine gleichmässige Anzahl Sporen für die anschliessend verwendete Suspension.

EPF	Nummer Mykotheke	Sporenkonzentration pro mL		
		2. Subkultur	5. Subkultur	10. Subkultur
<i>B. Bassiana</i>	6	$3.36 \cdot 10^7$	$2.28 \cdot 10^7$	$1.71 \cdot 10^7$
	19	$1.30 \cdot 10^7$	$3.15 \cdot 10^7$	$4.12 \cdot 10^7$
<i>M. anisopliae</i>	74	$5.58 \cdot 10^7$	$1.19 \cdot 10^7$	$1.01 \cdot 10^7$
	125	$1.73 \cdot 10^6$	$2.63 \cdot 10^6$	$1.45 \cdot 10^6$
<i>M. brunneum</i>	36	$9.80 \cdot 10^7$	$9.78 \cdot 10^7$	$4.70 \cdot 10^7$
	115	$7.55 \cdot 10^7$	$6.21 \cdot 10^7$	$8.16 \cdot 10^7$
<i>M. robertsii</i>	40	$3.03 \cdot 10^7$	$1.07 \cdot 10^7$	$5.80 \cdot 10^7$
	75	$2.61 \cdot 10^7$	$4.79 \cdot 10^7$	$7.33 \cdot 10^7$
<i>I. fumosorosea</i>	138	$5.38 \cdot 10^6$	$2.97 \cdot 10^7$	$3.23 \cdot 10^7$

### 6.3.2 Mortalitätsanalyse

Bei der Auswertung aller erhobenen Daten der neun untersuchten Pilzstämme und unter Berücksichtigung des Vergleichs aller drei Mortalitätskurven nahm die Virulenz durch seriell Subkultivieren auf frische Nährmedien nicht signifikant ab ( $p = 0.098$ ). Bei der 2. Subkultur mussten drei (wovon eine Larve 12 Tage überlebte), bei der 5. Subkultur zwölf (von denen elf bis am Ende lebten) und bei der 10. Subkultur 21 Larven (wobei neun Larven nicht an der Infektion verendeten) durch das Eintreten eines natürlichen Todes aus den Berechnungen ausgeschlossen, sprich zensiert werden. Der geschätzte  $LT_{50}$ -Wert wurde bei der 2., 5. und 10. Subkultur am fünften, fünften, respektive am sechsten Tag der Versuchsdauer erreicht. In Tabelle 7 sind die geschätzten  $LT_{50}$ -Werte der Abbildung 7 mit den zugehörigen Konfident-Level dargestellt. In Tabelle 8 sind die dazugehörigen Rohdaten (S. 46).



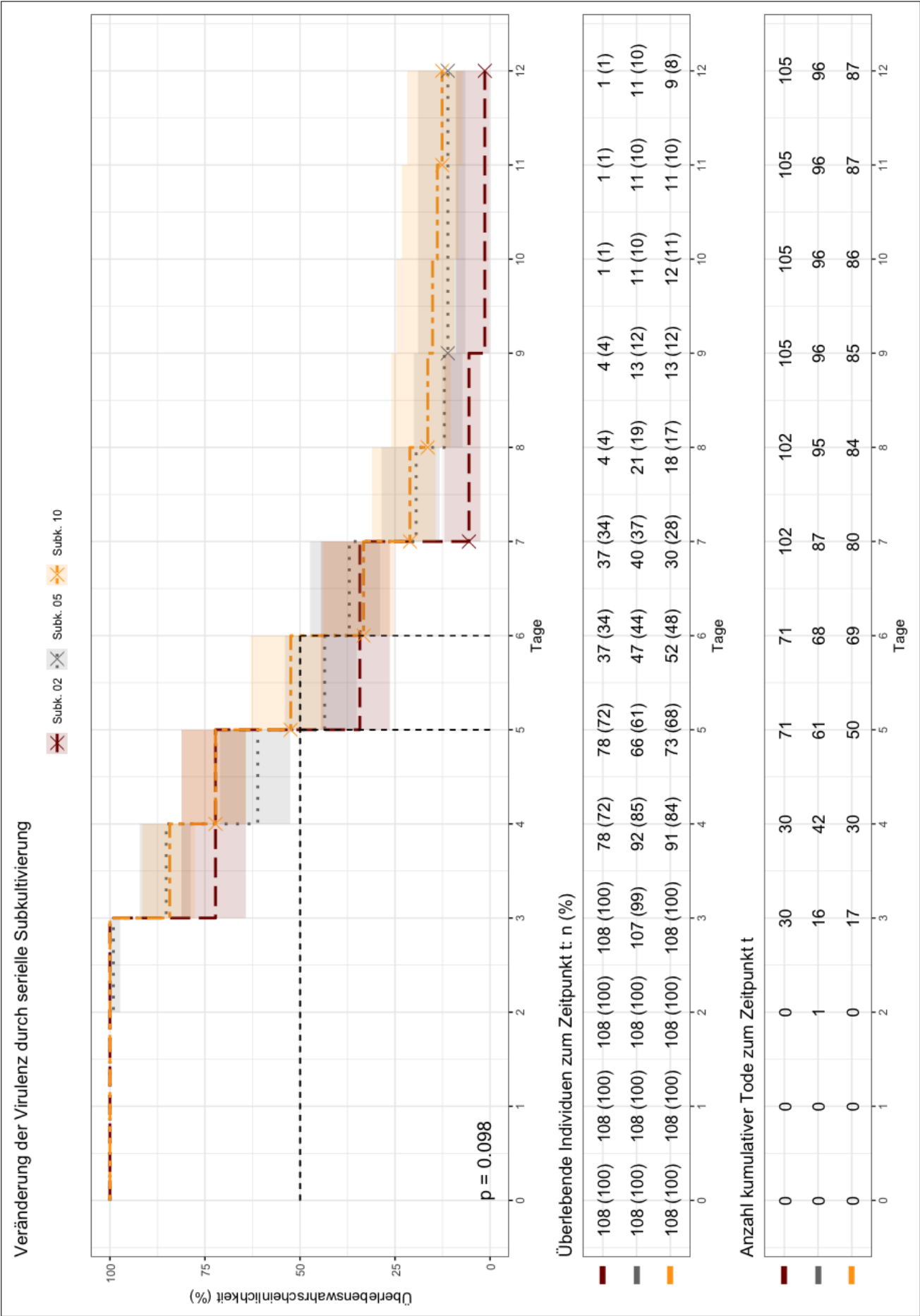


Abbildung 7: Vergleich aller drei Überlebendenswahrscheinlichkeitskurven. Errechnet mit dem Kaplan-Meier-Modell. Bildbeschreibung auf der nächsten Seite.

Abbildung 7: Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeit mit Hilfe des Kaplan-Meier-Modells von *Galleria mellonella*-Larven während den drei durchgeführten Mortalitätsanalysen mit der 2. (rot), 5. (grau) und 10. (gelb) Subkultur. Diese Abbildung beinhaltet die Daten aller neun getesteten Pilzstämme. Die gestrichelten und/oder gepunkteten Linien stellen die Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent zum Zeitpunkt  $t$  dar. Die gleichfarbigen Schattierungen bilden jeweils die oberen und unteren 95%-Konfidenz-Intervalle ab. Die mit  $X$  markierten Zeitpunkte auf den Kurven visualisieren zensierte Ereignisse. Damit sind Larven gemeint, die an anderen Umständen als einer Pilzinfektion verendeten und so nicht in die Berechnung miteinfließen. Die mit  $X$  markierten Zeitpunkte am rechten Ende der Mortalitätskurven deuten auf Individuen hin, die die Versuchsdauer von zwölf Tagen überlebten. Die noch lebenden Individuen pro Zeitpunkt können in der Tabelle «Überlebende Individuen zum Zeitpunkt  $t$ :  $n$  (%)» entnommen werden. Der dahinter in Klammern stehende Wert ist die jeweils dazugehörige Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent. In der unteren Tabelle sind die kumulativen Tode der Larven pro Zeitpunkt  $t$  abgebildet. Mit dieser Tabelle können beim Zeitpunkt  $d = 12$  Rückschlüsse über die Ausfälle, also die Anzahl zensierter Daten, gezogen werden. Von den zu Beginn 108 Larven mussten dementsprechend bei der 2. Subkultur drei, bei der 5. Subkultur zwölf und bei der 10. Subkultur 21 Larven durch das Eintreten eines «natürlichen Todes» aus den Berechnungen ausgeschlossen, sprich zensiert werden. Hierzu werden aber auch jene Larven gezählt, die nach zwölf Tagen Versuchsdauer die Pilzinfektion überlebt haben. Der  $p$ -Wert gibt an, ob sich zwei der drei abgebildeten Überlebenswahrscheinlichkeits-Kurven signifikant voneinander unterscheiden.

Ein Beispiel zum Verständnis: Betrachtet wird die 10. Subkultur (gelb). Zu Beginn wird die untere Tabelle betrachtet. Am Tag 3 wurde der Tod von 17 Larven notiert. In der oberen Tabelle sind dementsprechend am Tag 4 noch 91 lebende Larven. Wieder in der unteren Tabelle: von Tag 3 auf Tag 4 sind weitere 13 Larven an einer Pilzinfektion verendet. In der oberen Tabelle sind bei Tag 5 aber nur 73 überlebende, obwohl 91 Überlebende minus den 13 zusätzlichen Toten 78 Überlebende ergeben sollte. D.h. von Tag 4 auf 5 mussten fünf Larven durch das Eintreten eines «natürlichen Todes» aus den Berechnungen ausgeschlossen werden, da ihr Überleben in der nachfolgenden Zeit unbestimmt blieb. Diese fünf ausgeschlossenen Larven werden zu den erwähnten zensierten Daten gezählt und in der Graphik selbst am Tag 5 mit einem  $X$  als Zensur-Ereignis dargestellt. Dies hat Einfluss auf die Berechnung folgenden Überlebenswahrscheinlichkeiten. Diesen Larven konnte kein klares Ereignis (hier Tod durch Pilzinfektion) zugeordnet werden und wurden ab dem Zeitpunkt der Zensur, hier Tag 5, nicht in die Berechnungen der folgenden Überlebenswahrscheinlichkeiten berücksichtigt. Durch diese Zensur kann die Überlebenswahrscheinlichkeit an den bestimmten Zeitpunkten der Datenerhebung realitätsgetreuer berechnet werden. In der unteren Tabelle werden also nur die an Pilzinfektionen gestorbenen Larven als Ereignis gezählt. In der oberen Tabelle sind die alle verzeichneten Tode abgebildet. Die Prozentzahl berücksichtigt aber die zensierten Daten. Eine genauere Betrachtung der Tabelle 8 hilft für das Verständnis dieser Grafik.

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der geschätzten  $LT_{50}$  der Abbildung 7 zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen.

Subkultur	Anzahl Larven Beginn	Tode durch Pilzinfektion	Median ( $LT_{50}$ )	Unteres 95% Konfidenz-Level	Oberes 95% Konfidenz-Level
<b>2.</b>	108	105	5	5	5
<b>5.</b>	108	96	5	5	6
<b>10.</b>	108	87	6	5	6

Tabelle 8: In dieser Tabelle sind die Zahlenwerte aus Abbildung 7 dargestellt und sollen ihre die Nachvollziehbarkeit verbessern. Die Werte sind auf drei Kommastellen gerundet.

	Tag	Überlebende Individuen	Tode	Zensierte Daten	Überlebens- wahrscheinlichkeit	Standard- fehler	Oberes 95% Konf-Int.	Unteres 95% Konf-Int.
<b>2. Subkultur</b>	3	108	30	0	0.722	0.06	0.812	0.643
	5	78	41	0	0.343	0.133	0.445	0.264
	7	37	31	2	0.056	0.397	0.121	0.026
	9	4	3	0	0.014	0.953	0.09	0.002
	12	1	0	1	0.014	0.953	0.09	0.002
<b>5. Subkultur</b>	2	108	1	0	0.991	0.009	1	0.973
	3	107	15	0	0.852	0.04	0.922	0.787
	4	92	26	0	0.611	0.077	0.71	0.526
	5	66	19	0	0.435	0.11	0.539	0.351
	6	47	7	0	0.37	0.126	0.474	0.287
	7	40	19	0	0.194	0.196	0.285	0.133
	8	21	8	0	0.12	0.26	0.2	0.072
	9	13	1	1	0.111	0.272	0.189	0.065
	12	11	0	11	0.111	0.272	0.189	0.065
<b>10. Subkultur</b>	3	108	17	0	0.843	0.042	0.914	0.777
	4	91	13	5	0.722	0.06	0.812	0.642
	5	73	20	1	0.524	0.093	0.63	0.437
	6	52	19	3	0.333	0.141	0.438	0.253
	7	30	11	1	0.211	0.2	0.311	0.143
	8	18	4	1	0.164	0.234	0.26	0.104
	9	13	1	0	0.151	0.248	0.246	0.093
	10	12	1	0	0.139	0.263	0.232	0.083
	11	11	1	1	0.126	0.279	0.218	0.073
	12	9	0	9	0.126	0.279	0.218	0.073

## 7 Diskussion

### 7.1 Morphologische Veränderungen

Die Hypothese 2 «*Der Phänotyp (hier Form und Farbe) der untersuchten Pilze verändert sich nicht.*» konnte unter der Betrachtung aller neun untersuchten Pilzstämme bestätigt werden ( $H_0$ : keine morphologischen Veränderungen,  $p = 0.05185$ ). Somit sind morphologische Veränderungen keine Konsequenz serieller Subkultivierung. Die sechs erkennbaren Veränderungen und der tiefe p-Wert weisen aber auf eine starke Tendenz hin. Die Anzahl Wiederholungen (hier neun) bei der Durchführung des Exakten Fisher-Tests darf als klein betrachtet werden, wodurch bei einer Erhöhung der Wiederholungen eine Widerlegung der These durchaus denkbar ist.

Der rötliche Ton beider *B. bassiana*-Stämme in der 10. Subkultur, könnte durch die sich unterscheidenden Lichtverhältnisse bei der Aufnahme der Fotos entstanden sein. Die Bilder wurden nicht zur selben Tageszeit und bedingt durch Umbauten der Schulgebäude, nicht im selben Labor fotografisch dokumentiert. S. Safavi (2012) untersuchte zwei *B. bassiana*-Stämme unter anderem auf phänotypische Veränderungen und erhielt Resultate (Fotobeweis), die mit den Resultaten in dieser Arbeit vergleichbar sind. Das reduzierte Wachstum von *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 36) wird im folgenden

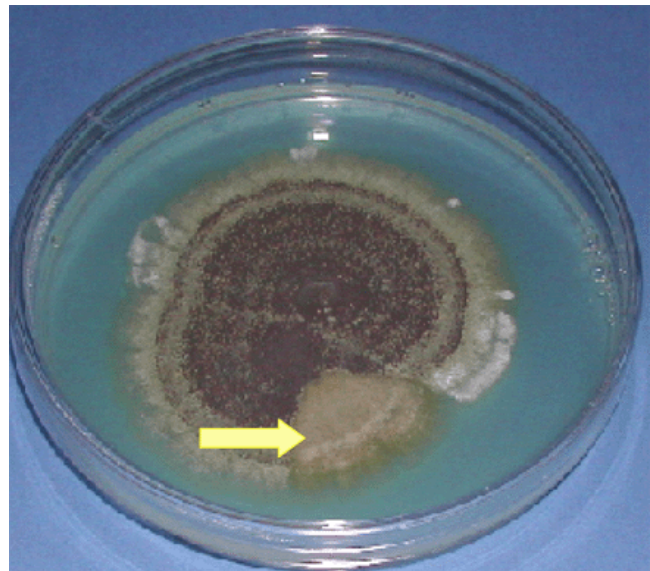


Abbildung 8: Eine Kultur von *M. anisopliae* (Stamm V 275) auf PDA (eng. potato dextrose agar). Gut erkennbar ist der typisch V-förmige Sektor mit spärlichem Wachstum und verringerter Sporulation (Pfeil) im Vergleich zur Hauptkultur. Aus F. A. Shah und Butt (2005), unverändert.

Kapitel behandelt. Die Ursachen für das auffallend degenerierte Wachstum von *B. bassiana* (Mykothek-Nr. 6), *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 115) sowie *I. fumosorosea* (Mykothek-Nr. 138) konnten im Rahmen der Recherchen zu dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Die Literatur weist auf dieses Problem hin (Butt & Goettel, 2000; Butt et al., 2006), liefert aber keine Antworten zu dessen Ur-

sache (Ansari & Butt, 2011; S. Safavi, 2012). Nur wenige Autoren beschäftigen sich mit morphologischen Veränderungen, die während einer seriellen Subkultivierung auftreten können. Es wird vor allem auf Literatur verwiesen, die die richtige Lagerung und Massenproduktion betreffen, um dieses Problem möglichst gering zu halten bzw. zu umgehen (Butt & Goettel, 2000; S. A. Safavi, 2011; F. A. Shah et al., 2005). Es scheint, die Wissenschaft beschäftigt sich zurzeit mehr mit der Isolation und Bestimmung virulenter EPF-Stämme und der Definition von Kriterien, die für die Auswahl eines EPF mit Potenzial zur Kommerzialisierung vonnöten sind, als mit den Ursachen für morphologische Veränderungen bei serieller Subkultivierung. Diese Annahme bekräftigen aktuelle Studien, die sich mit der Analyse und Bestimmung von Genen, die mit der Virulenz in Verbindung stehen könnten, beschäftigen (Eivazian Kary & Alizadeh, 2017; Jirakkakul et al., 2018). Die von Butt et al. (2006) beschriebenen Veränderungen, die sich in zum Beispiel verringerter Sporenproduktion verkörpern können, dürfen mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden und müssen in zukünftigen Arbeiten berücksichtigt werden. Die in (F. A. Shah & Butt, 2005) dokumentierte Bildung von Wachstumssektoren mit häufig verringerter Sporenbildung konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 8 mit Kapitel 6.1 Morphologische Veränderungen der Pilzkulturen).

## 7.2 Pilzwachstum

Die Resultate ( $p = 0.115$ ) bestätigen die Hypothese 3 der gleichbleibenden Wachstumsrate bei serieller Subkultivierung. Eine abnehmende Tendenz ist dennoch bei allen neuen Pilzstämmen dieser Arbeit erkennbar. S. Safavi (2012) untersuchte vergleichbar die Wachstumsrate zweier *B. bassiana*-Stämme nach 15 Tagen Inkubationszeit und konnte keine signifikante Reduktion bei serieller Subkultivierung nachweisen. Eine analoge Tendenz kann aber aus der Grafik in der Studie dieses Autors entnommen werden. Nahar et al. (2008) berücksichtigten in ihrer Studie über Veränderungen in der Virulenz eines *M. anisoplia*-Stammes bei serieller Subkultivierung die Wachstumsrate und konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der ersten und vierzigsten Subkultur feststellen. Diese Resultate widersprechen dem signifikant abnehmenden Wachstum

des *M. anispoliae*-Stammes 125. Wie aber aus Butt et al. (2006) entnommen werden kann, sind Veränderungen bzw. eine Degeneration im Wachstum stammesabhängig. Recherchen lieferten keine Resultate zu Studien, die spezifisch Veränderungen im Wachstum ausgehend von serieller Subkultivierung bei den EPF *M. brunneum*, *M. robertsii* und *I. fumosorosea* untersuchten bzw. berücksichtigten. Ansari und Butt (2011) verzeichneten aber eine signifikant erhöhte Sektorbildung bei serieller Subkultivierung von *M. brunneum*. Vandenberg und Cantone (2004) notierten ein abnehmendes Myzel-Trockengewicht zweier *I. fumosorosea*-Stämme, dass aber bei Passagen durch die Getreideläuse *Diuraphis noxia* wieder zunahm. Die Wichtigste Erkenntnis aus den Recherchen ist, dass die Wahl des Nährmediums signifikanten Einfluss auf die Wachstumsrate und Sporenbildung entomopathogener Pilze hat (Hussain et al., 2010; F. A. Shah et al., 2005) und falls Veränderungen im Wachstum nachgewiesen werden konnten, mit einer Reduktion und keiner Zunahme zu rechnen ist.

Bei der in dieser Arbeit klar ersichtliche Tendenz einer abnehmenden Wachstumsrate bei serieller Subkultivierung dürfen operative Ungenauigkeiten nicht ausgeschlossen werden. Die Nährmedien für die Inokulation der Pilze wurden von Hand erstellt. Somit besteht die Möglichkeit ungleicher Nährstoffmengen in den Petrischalen, was bekanntermassen Einfluss auf das Wachstum von Pilzen haben kann (F. A. Shah & Butt, 2005). Ebenso muss die Anzahl Wiederholungen berücksichtigt werden. Wie aus Abbildung 6 (S. 42) zu entnehmen ist, wurden bei der 2. Subkultur vier, während bei der 5. und 10. Subkultur jeweils zehn Pilzflächen gemessen. Dieser Unterschied beeinflusste die erhaltenen Resultate durch eine höhere Gewichtung der 5. und 10. Subkultur bei der Berechnung der Regressionsanalyse.

### 7.3 Mortalitätsanalyse

Die Abbildung 7 im Kapitel 6.3.2 Mortalitätsanalyse (S. 44) visualisiert das Kaplan-Meier-Modell angewendet auf alle neun untersuchten Pilzstämme. Die Hypothese der abnehmenden Virulenz bei serieller Subkultivierung konnte mit dem Vergleich aller drei Mortalitätskurven nicht bestätigt werden ( $p = 0.098$ ). Eine starke Tendenz ist aber erkennbar. Zwei Faktoren hatten mit hoher Wahrscheinlichkeit grossen Einfluss auf das Resultat. Einerseits die nicht tägliche

Aufnahme der Mortalität während des Bioassays der 2. Subkultur, andererseits die Qualität der *G. mellonella*-Larven während der Mortalitätsanalyse der 10. Subkultur. Ein weiterer Einflussfaktor war statistischer Natur.

Die Mortalität der Larven während des ersten Bioassays (2. Subkultur) konnte aus Ausbildungsgründen nicht täglich dokumentiert werden. Die Mortalität wurde am ersten bis dritten, fünften, siebten, neunten und am zwölften Versuchstag notiert. Die entstehenden Datenlücken führten zu einer Erhöhung des geschätzten  $LT_{50}$  der Analysen mit der 2. Subkultur. Vergleiche dazu in Abbildung 7 die Tabelle *Anzahl kumulativer Tode zum Zeitpunkt  $t$* . In dieser Abbildung sind von Tag 4 auf Tag 5 41 zusätzliche Ereignisse (hier Tod einer Larve; am Tag 5 waren bereits 71 Larven tot) zu entnehmen. Am sechsten Versuchstag traten laut Modell keine Ereignisse ein. Somit entspricht die Anzahl Ereignisse des sechsten Tages jener vom fünften Versuchstag. Hätte die Mortalität täglich aufgenommen werden können, würden sich die Ereignisse am sechsten Tag mit hoher Sicherheit von jener am fünften Tag unterscheiden. Diese Annahme kann durch die stetig sinkenden Mortalitätskurven aller drei Subkulturen begründet bzw. bestärkt werden. Somit wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit am Tag 6 im Modell der Realität widersprechend als zu hoch eingestuft. Da Datenlücken am vierten, sechsten und achten Versuchstag entstanden, kann von einer zu hohen Schätzung des  $LT_{50}$  bei Analysen der 2. Subkultur ausgegangen werden. Die in Anhang B abgebildeten Auswertungen jedes Pilzstammes verdeutlichen diese Problematik. Bei diesen konnte lediglich bei *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 36), *M. robertsii* (Mykothek-Nr. 75) und *I. fumosorosea* (Mykothek-Nr. 138) eine signifikante Abnahme der Virulenz nachgewiesen werden. Bei *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 115) und *M. robertsii* (Mykothek-Nr. 40) wurde eine signifikante Zunahme der Virulenz bewiesen. Diese wurde aber mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Datenlücken am sechsten Tag bei *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 115) und bei *M. robertsii* (Mykothek-Nr. 40) am vierten Versuchstag verursacht. Der Vergleich mit anderen Studien ist dadurch und durch die Anhängigkeit der abnehmenden Virulenz vom jeweilig untersuchten Pilzstamm erschwert. Die Stammspezifität ist im Kapitel 4 Mortalitätsanalysen mit entomopathogenen Pilzen beschrieben und gilt als Auswahlkriterium für ein kommerzialisierbares Isolat (Brownbridge et al., 2001).



Der zweite Einflussfaktor war die Qualität der Insekten, die beim letzten Bioassay verwendet wurden. Im Vergleich zu den vorigen Bioassays verpuppten sich die Larven früher und in insgesamt grösserer Zahl. Aus Tabelle 8 können die zensierten Daten zu jedem Zeitpunkt der Datenerhebung entnommen werden (in Abbildung 7 mit einem *X* gekennzeichnet). Hier können ebenfalls Tiere, die wegen dem Eintreten eines «natürlichen Todes» aus den Berechnungen ausgeschlossen werden mussten, nachvollzogen werden. So mussten beim 1. Bioassay zwei, beim 2. Bioassay eine und beim 3. Bioassay insgesamt 12 Insekten als zensiertes Ereignis dokumentiert werden. Das im Vergleich frühere Verpuppen könnte durch die jahresbedingten höheren Temperaturen gelegen haben (der erste Bioassay wurde im März, der dritte im Juli 2019 durchgeführt). Die höheren Temperaturen beeinflussten den Metabolismus der Larven positiv, während dem sie noch vor dem Kauf im Tierladen «Qualipet» für einige Tage ungekühlt lagerten (Smietanko, Wiśniewski & Cymborowski, 1989). Dadurch verkürzte sich wahrscheinlich die Zeit bis zur Metamorphose. Wie sich dies auf die Pilzinfektionen auswirkte ist unklar. Bei der Arbeit mit diesen Larven entstand unter anderem der Eindruck, dass die Qualität (Gesundheitszustand) im Vergleich zu den zuvor verwendeten Insekten niedriger war (vgl. Abbildung 9).

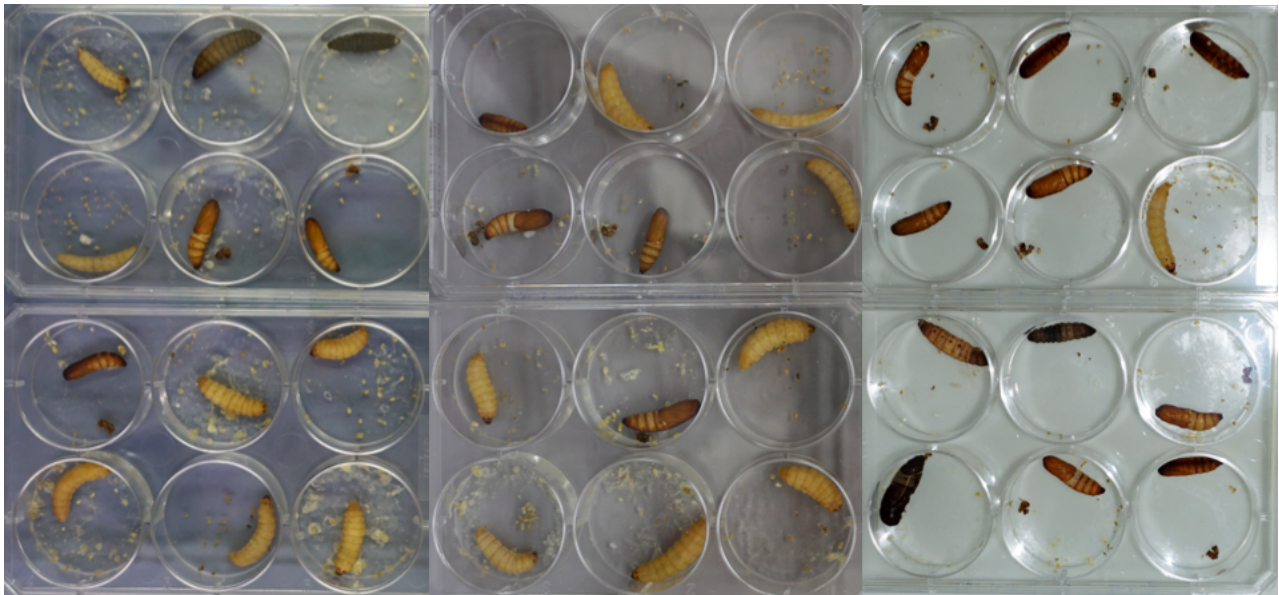


Abbildung 9: Vergleich der Kontrollgruppen zur Nachvollziehbarkeit der minderen Qualität der Insekten bei der letzten Mortalitätsanalyse. Von links nach rechts: 2., 5. und 10. Subkultur. Die Bilder stammen vom zwölften Versuchstag. 2. Subkultur: drei verpuppende und zwei tot, 5. Subkultur: vier sich verpuppend und 10. Subkultur: drei verendet an einem natürlichen Tod und acht sich verpuppend, wobei gerade eine Larve ihr natürlich elfenbeinfarbenes Aussehen bis zum Ende des Versuches behielt. Bild: A. Rutzer.



Ein zusätzlicher Faktor, mit Einfluss auf den erhaltenen p-Wert, war die statistische Fehlerwahrscheinlichkeit. Bei einem multiplen Paarvergleich (hier dreier Mortalitätskurven) erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art (die Annahme eines systematischen Unterschieds, obwohl es nur eine Zufallsschwankung war). Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde als  $\alpha = 0.05$  festgelegt. Die Wahrscheinlichkeit, dass kein Fehler 1. Art auftritt ist also  $\gamma = 1 - \alpha = 0.95$ . Wenn nun drei Vergleiche gemacht werden (alle mit allen), dann ist die Wahrscheinlichkeit, dass nie ein Fehler 1. Art auftritt  $\gamma^3 \approx 0.86$  und somit ist die Wahrscheinlichkeit eines Fehler 1. Art  $1 - \gamma^3 = 0.14$ . Statistische Tests mit mehr als zwei Stichproben korrigieren dies, wodurch der p-Wert etwas höher ausfällt. Beim alleinigen Vergleich der 2. und 10. Subkultur sank der p-Wert auf 0.044. Somit konnte die Hypothese mit dem Vergleich der Daten des ersten und letzten Bioassys dennoch mit statistischer Signifikanz bestätigt werden. Auf die Abbildung dieser Auswertung wurde aus Gründen der Nachvollziehbarkeit der Daten verzichtet.

### **Zusammenhang des Virulenzverlustes und morphologischer Degeneration**

Eine unveröffentlichte Beobachtung von Tariq M. Butt in (Butt et al., 2006) beschrieb einen Zusammenhang zwischen abnehmender Virulenz und morphologischen Degenerationen. Dies konnte bei den Pilzstämmen mit signifikant abnehmender Virulenz ebenfalls beobachtet werden. Die beiden Pilze *M. robertsii* (Mykothek-Nr. 75) und *I. fumosorosea* (Mykothek-Nr. 138) verminderten ihr Wachstum bei serieller Subkultivierung signifikant und wiesen degeneriertes Wachstum auf. Beim EPF *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 36) reduzierte sich nur das Wachstum signifikant, ohne dass sich seine Morphologie visuell erkennbar veränderte. Es ist aber fraglich, ob das reduzierte Wachstum wirklich durch eine morphologische Degeneration verursacht wurde oder die im Kapitel 7.2 Pilzwachstum beschriebenen operativen Ungenauigkeiten dafür verantwortlich waren. Eine genauere Untersuchung dieses Themenfeldes könnte, falls Zusammenhänge gefunden werden, das Auswahlverfahren für potentiell kommerzialisierbare EPF deutlich vereinfachen.

## 7.4 Potential der untersuchten Pilze als Bioagentien

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht pro Pilzstamm, ob Veränderungen in Phänotyp, Wachstumsrate und Virulenz nachgewiesen wurden. Zusätzlich ist der LT<sub>50</sub> der Analysen mit der 2. Subkultur abgebildet. Die «fett» markierten Pilzstämme werden für weitere Untersuchungen empfohlen.

EPF	Vermindertes Wachstum	Morphologische Degeneration	LT <sub>50</sub> zu Beginn	Abnahme der Virulenz
<b><i>B. bassiana</i></b> (Mykotheke-Nr. 6)		X	7	
<b><i>B. bassiana</i></b> (Mykotheke-Nr. 19)			7	
<b><i>M. anisopliae</i></b> (Mykotheke-Nr. 74)			6	
<i>M. anisopliae</i> (Mykotheke-Nr. 125)	X	X	5	
<i>M. brunneum</i> (Mykotheke-Nr. 36)	X		5	X
<b><i>M. brunneum</i></b> (Mykotheke-Nr. 115)		X	7	
<b><i>M. robertsii</i></b> (Mykotheke-Nr. 40)			5	
<i>M. robertsii</i> (Mykotheke-Nr. 75)	X	X	6	X
<i>I. fumosorosea</i> (Mykotheke-Nr. 138)	X	X	3	X

Nachfolgend werden anhand der gesammelten Daten Empfehlungen für weitere Untersuchungen der analysierten Pilzstämme abgegeben. Dabei wurde die Konsistenz der Virulenz am höchsten gewichtet. Aussagen über die Virulenz sollen mit den Daten aus Anhang B verglichen werden.

Beide *B. bassiana*-Stämme zeigten gleichbleibende Virulenz und keine Wachstumsverminderung. *B. bassiana* (Mykotheke-Nr. 6) behielt eine Mortalitätsrate von 100% auch nach zehnfacher Subkultivierung. Beide Stämme werden daher für weitere Untersuchungen vorgeschlagen. Gleiches gilt für den *M. anisoploae*-Stamm mit der Mykotheke-Nr. 74. *M. anisoploae* (Mykotheke-Nr. 125) wies zwar morphologische Veränderungen auf. Diese zeigten sich lediglich in der früheren Ausbildung von grünfarbigem Myzel, was als nicht schwerwiegend eingestuft wurde. Bei diesem Stamm führte die verhältnismässig geringe Anzahl isolierbarer Sporen zum Ausschluss (vgl. Tabelle 6). *M. brunneum* (Mykotheke-Nr. 36) ist mit *M. robertsii* (Mykotheke-Nr. 75) und *I. fumosorosea* (Mykotheke-Nr. 138) durch die signifikante Abnahme der Virulenz und starken morphologischen Veränderungen von weiteren Untersuchungen auszuschliessen. *M. brunneum*

(Mykothek-Nr. 115) und v.a. *M. robertsii* (Mykothek-Nr. 40), durch seine hohe Pathogenität (vgl.  $LT_{50}$ ), werden für weitere Analysen empfohlen. Diese Empfehlungen müssen aber durch die geringe Anzahl Wiederholungen (vgl. Kapitel 7.5 Reflektion der Methoden, unten) mit Vorsicht betrachtet werden.

Interessanterweise verursachten alle hier getesteten Pilzstämme bei der Mortalitätsanalyse der 2. Subkultur, mit Ausnahme von *B. bassiana* (Mykothek-Nr. 6), eine Mortalität von 100% nach spätestens neun Tagen (vgl. Abbildung 7). Dies widerspricht zum Beispiel Mascarin et al. (2013), die Stämme von *B. bassiana* und *I. fumosorosea* gegen *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) testeten und nach acht Tagen eine Mortalität von 71-86% erreichten. Ähnliche Resultate erhielten Eckard et al. (2014). Sie untersuchten die Virulenz dreier *M. brunneum*-Stämme gegen Drahtwürmer (Coleoptera - Elateridae). Der Stamm mit der höchsten Virulenz wurde in der Schweiz isoliert und erreichte eine Mortalität zwischen 73 und 83%, wobei die  $LT_{50}$  bei 21 Tagen nach Inokulation ermittelt wurde. Hauptunterschied des Bioassays dieser Arbeit zu den genannten und ähnlichen Studien ist das Zielinsekt. Wie in Kapitel 3.3 Abwehrreaktionen des Wirtes beschrieben, reagiert *G. mellonella* empfindlich gegenüber vielen abiotischen und biotischen Einflüssen und dient daher oft als Modellorganismus. Aus diesem Grund müssen notwendigerweise zusätzliche Untersuchungen mit den hier getesteten Pilzen an anderen Zielorganismen durchgeführt werden. Dennoch konnte hier die Auswahl der Pilzstämme für zukünftige Untersuchungen eingeschränkt werden.

## 7.5 Reflektion Methodik

### 7.5.1 Inokulation der Pilzkulturen und die Messung des Pilzwachstums

Für die Inokulation der EPF wurde das Medium Corn Steep-Agar verwendet. Die Mehrheit der Studien, die die Problematik der abnehmenden Virulenz oder Pilzwachstum untersuchen, verwendeten das Medium PDA (Poato Dextrose Agar, Hussain et al. (2010); Jirakkakul et al. (2018); Nahar et al. (2008); F. A. Shah und Butt (2005)). Bekanntermassen beeinflusst aber das gewählte Medium, besonders dessen Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis, teils stark die Entwicklung und Virulenz der kultivierten Pilze (S. A. Safavi et al., 2007; F. A. Shah et al., 2005). Für genauere Vergleiche der durchgeführten Arbeit mit bestehenden Studien hätte das PDA-Medium gewählt werden sollen. Wie stark aber das Corn Steep-Agar Wachstum und Virulenz im Vergleich zum PDA-Medium beeinflusst, ist unklar.

Die gewählte Inokulationsmethode darf als erfolgreich angewendet betrachtet werden. Von den in dieser Arbeit über 460 erstellten Pilzkulturen konnten bei lediglich acht Kulturen Kontaminationen (eine bakteriell, die restlichen von Pilzen verursacht) festgestellt werden. Einzig die vierfache Wiederholung zu Beginn beim Erstellen der seriellen Subkultivierungsreihe hatte Einfluss auf die Resultate. Dies entstand durch eine Umformulierung der Fragestellungen dieser Arbeit, wurde aber mit den betreuenden Personen besprochen und durch die bestehenden, zeitlichen Rahmenbedingungen für die Durchführung der Arbeit genehmigt.

Bei den Messungen der Pilzfläche bestand die Schwierigkeit darin Kulturen, mit nur einem Wachstumszentrum herzustellen (siehe Kapitel 5.2 Messung des Pilzwachstums). Diese Inkonsistenz beeinflusste ebenfalls die Vergleichbarkeit der Wachstumsflächen über einen längeren Zeitraum. Dieses Problem ist wahrscheinlich durch die spezifischen Wachstumsweisen der Pilze kaum zu umgehen. Eine in Choi et al. (1999) beschriebene Isolationsmethodik könnte aber bei zukünftigen Untersuchungen, in denen Reisolierungen von Pilzen aus Insektenkadavern benötigt werden, sehr hilfreich sein. Das Planimeter hingegen wurde als geeignetes Instrument für Flächenmessungen empfunden. Die Proble-

matik dabei war wie im Kapitel 5.2 Messung des Pilzwachstums beschrieben, die Wachstumsflächen nicht am Boden der Petrischale einzeichnen zu können. Dies hätte mit dem transparenteren PDA-Medium umgangen werden können (vgl. dazu Abbildung 8, S. 47).

### **7.5.2 Mortalitätstest zur Bestimmung der Virulenz mit *Galleria mellonella* Larven**

Die Herstellung von Sporensuspensionen mit einer Konzentration von  $x \times 10^6$  war mit der im Kapitel 5.3.1 Herstellung der Sporen-Suspensionen beschriebenen Methodik erfolgreich (vgl. Tabelle 3). Die Auszählung der *M. robertsii*-Sporen (Mykothek-Nr. 75) war durch ihre kleine Grösse beim Bestimmen der originalen Konzentration, die direkt von der Kulturplatte isoliert werden konnte, erschwert (Beobachtung von A. Rutzer). Die angegebenen Konzentrationen in Tabelle 6 könnten daher von Werten zukünftiger Auszählungen abweichen. Um die Versuchsinsekten mit Pilzsporen zu infizieren, tauchen viele Autoren ihre Tiere in vorbereitete Sporensuspensionen (Mohammadbeigi, 2013; S. A. Safavi et al., 2007; F. A. Shah & Butt, 2005) oder benutzten einen Präzisions-Mikrosprühturm (Mascarin, 2013; Mascarin et al., 2013). Diese Methoden unterscheiden sich zwar von der hier angewandten Methodik. Dennoch konnten Versuchstiere erfolgreich infiziert und vergleichbare Resultate erzielt werden. Innerhalb eines Arbeitstages konnten von neun Pilzstämmen Sporen von der Kulturplatte isoliert und ausgezählt, eine Sporensuspension mit bestimmter Konzentration erstellt und die Larven für die Mortalitätsanalyse vorbereitet werden. Ein weiterer Vorteil war die Nutzung fünf Wochenalter Pilzkulturen für die Herstellung der Suspensionen. Allfällige Kontaminationen konnten dadurch ausgeschlossen werden. Der ausgeführte Bioassay darf als erfolgreich durchgeführt betrachtet werden. Ob durch Eintauchen der Insekten in eine vorbereitete Sporensuspension oder durch die Benutzung eines Präzisions-Mikrosprühturm massgeblich Zeit eingespart werden kann, ist ungewiss. Mit den Methoden anderer Autoren kann aber auf das Transferieren der Larven in trockene Behälter am zweiten Versuchstag verzichtet werden. Mit der Verwendung von 9 cm Petrischalen kann dieser Arbeitsschritt ebenfalls übersprungen werden. Die Multiwell-Petrischalen wurden hier für eine übersichtliche Fotodokumentation gewählt und werden für zukünftige Untersuchungen ähnlicher Art empfohlen.

Die langanhaltende Feuchtigkeit über 24 Stunden begünstigte wahrscheinlich die Keimung der Pilzsporen und schädigten die Insekten gering bis gar nicht (vgl. Abbildung 9). Ausschlaggebender Faktor bei der Bestimmung der Virulenz und deren Abnahme ist die Anzahl Wiederholungen. Wie Hajek et al. (2012) betont muss ein Bioassay mit verschiedenen Sätzen des Inokulums und an verschiedenen Tagen beginnend mehrmals durchgeführt werden. Diese Voraussetzung wurde hier nicht erfüllt und muss in Zukunft für die Konsistenz der Ergebnisse gewährleistet werden. So sollten sich Autoren von späteren Untersuchungen auf wenige Pilzstämme fokussieren. Ebenso müssen bei der Anwendung des Kaplan-Meier-Modells die im Kapitel 7.3 Mortalitätsanalyse beschriebenen Problematiken mit fehlenden Daten berücksichtigt werden. Diese haben v.a. grossen Einfluss auf Resultate bei Untersuchungen mit kurzer Versuchsdauer, wie in der vorliegenden Arbeit. Weiter empfiehlt es sich Insekten, die an einer Mykose verendeten, auf Nährmedien zu kultivieren, um den Tod des Insektes durch den Pilz abschliessend verifizieren zu können.

### 7.5.3 Statistische Auswertung

Nach Jager et al. (2008) gehört die Kaplan-Meier-Methode zu den populärsten Methoden für Überlebensanalysen und fand in einigen Studien mit ähnlicher Problemstellung Verwendung (Carrillo et al., 2015; Eckard et al., 2014; Mascarin et al., 2013). In dem Modell verbergen sich aber einige Risiken. Das Problem mit der zu hohen Einschätzung des  $LT_{50}$  durch fehlende Daten wurde im Kapitel 7.3 Mortalitätsanalyse beschreiben. Ein weiteres Risiko besteht in der Interpretation der erzeugten Grafik. Der Fokus des Lesers wird zwangsweise auf die rechte Seite der Grafik gelenkt, also dort wo der Plot aufhört. In diesem Bereich bestehen aber die grössten Unsicherheiten, da hier mit der konstanten Verringerung der Anzahl Testobjekte auch die Informationsmenge abnimmt (Pocock, Clayton & Altman, 2002). So beinhalten die rechten Seiten der in dieser Arbeit abgebildeten Überlebenswahrscheinlichkeits-Grafiken nur wenige Individuen. Um diese Problematik zu verdeutlichen, wurden zu jeder Kaplan-Meier-Analyse die Rohdaten zur Verfügung gestellt (vgl. z.B. die abnehmenden Konfidenz-Intervalle der Tabelle 8). Diese Problematik verdeutlichte sich v.a. bei den Auswertungen der einzelnen Pilzstämme, bei denen jeweils nur zwölf Testobjekte eingesetzt wurden. Mit der oben beschriebenen Wiederho-

lung verschiedener Sätze desselben Inokulums hätte dieses Problem vermindert und die Teststärke verbessert werden können.

## 7.6 Konklusion und Ausblick

Hauptziele der Arbeit waren die Bestimmung der Virulenz ausgewählter Pilzstämme und deren Verlust bei serieller Subkultivierung auf frische Nährmedien. Wie die Diskussion der Resultate zeigt, konnten diese Ziele erfüllt werden. Diese Arbeit bestätigt die entstehenden Schwierigkeiten bei Versuchen, die eine serieller Subkultivierung von Pilzkulturen beinhalten und die daraus entstehenden Probleme bei der Massenproduktion von Bioagentien. Zudem können aus dieser Arbeit entscheidende Rückschlüsse über die sachgerechte Handhabung einer Mykothek gezogen werden, da wie nun bekannt seriell Subkultivieren Pathogenität und Morphologie beeinflussen können. Diese Arbeit ergab wichtige Informationen über das Potential einiger Pilzstämme, die von der Hochschule ZHAW Wädenswil isoliert wurden. Diese Arbeit ist daher Ausgangslage für weitere Forschungsfragen:

- *Die genauere Untersuchung bestimmter EPF gegenüber Maikäferlarven.*

Die empfohlenen Pilzstämme können nun auf ihre Pathogenität gegenüber verschiedenen Zielorganismen getestet werden. Besonders gegenüber dem von Mustafa (2016) erwähnten Maikäfer *Melolontha melolontha*.

- *Die genauere Untersuchung potentieller Bioagentien auf Basis entomopathogener Pilze gegenüber Nicht-Zielorganismen.*

Gleich den Untersuchungen mit Zielinsekten müssen versuche mit Nicht-Zielorganismen durchgeführt werden. Diese wie die obere Empfehlung müssen zwingend im Labor sowie unter Feldbedingungen untersucht werden.

- *Langzeittest mit entomopathogenen Pilzen über deren Beständigkeit unter Feldbedingungen.*

Langzeittests über das Fortbestehen der Pilze im Boden müssen durchgeführt werden. Mit dem Ziel eine ungefähre Grösse definieren zu können, wie lange mit Folgeinfektionen eines einmal applizierten EPF gerechnet werden darf.

- *Entomopathogene Pilze als Endophyten?*

Die in dieser Arbeit untersuchten Pilze wurden aus der Rhizosphäre verschiedener Pflanzen isoliert. Jaber und Ownley (2018) berichten über sich positiv ergänzende Pilz-Pflanzen-Interaktionen. Sie erwähnen alle der hier getesteten Pilze in einem positiven Zusammenhang mit verschiedensten Pflanzen. Die genauere Untersuchung solcher EPF-Pflanzen-Interaktionen und daraus neu entstehende Möglichkeiten im Pflanzenschutz bieten ein noch wenig untersuchtes Forschungsfeld.

- *Die Bestimmung einer Korrelation zwischen abnehmender Virulenz von entomopathogenen Pilzen und morphologischer Degeneration.*

Die Resultate dieser Arbeit und eine unveröffentlichte Beobachtung von Butt et al. (2006) liefern Hinweise auf Zusammenhänge zwischen morphologischer Degenerationen und abnehmender Virulenz von entomopathogenen Pilzen bei serieller Subkultivierung. Eine genauere Untersuchung dieses Umstandes könnte die Auswahl potentieller EPF massgeblich vereinfachen.

Somit ist die Erforschung entomopathogener Pilze als Alternative zu chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmitteln ein noch wachsendes Forschungsfeld mit beträchtlichem Potential.



# Literatur

- Ansari, M. & Butt, T. (2011, Juni). Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi: Effects of subculturing of entomopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 110 (6), 1460–1469. Zugriff am 2019-09-23 auf <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2011.04994.x> doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04994.x
- Araújo, J. & Hughes, D. (2016). Diversity of Entomopathogenic Fungi. In *Advances in Genetics* (Bd. 94, S. 1–39). Elsevier. Zugriff am 2019-08-14 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065266016300013> doi: 10.1016/bs.adgen.2016.01.001
- Arthurs, S. & Thomas, M. B. (2001, August). Effects of Temperature and Relative Humidity on Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in Mycosed Cadavers of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78 (2), 59–65. Zugriff am 2019-09-06 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201101950505> doi: 10.1006/jipa.2001.5050
- Beakes, G. W., Glockling, S. L. & Sekimoto, S. (2012, Januar). The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. *Protoplasma*, 249 (1), 3–19. Zugriff am 2019-08-27 auf <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0269-2> doi: 10.1007/s00709-011-0269-2
- Benny, G. L. (2009). *Zygomycetes*. Zugriff am 2019-08-29 auf <http://zygomycetes.org/>
- Bidochka, M. J., Clark, D. C., Lewis, M. W. & Keyhani, N. O. (2010, Juli). Could insect phagocytic avoidance by entomogenous fungi have evolved via selection against soil amoeboid predators? *Microbiology*, 156 (7), 2164–2171. Zugriff am 2019-09-11 auf <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.038216-0> doi: 10.1099/mic.0.038216-0
- Binder, U., Maurer, E. & Lass-Flörl, C. (2016, Februar). *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. *Fungal Biology*, 120 (2), 288–295. Zugriff am 2019-09-26 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614615001002> doi: 10.1016/j.funbio.2015.06.002
- Blackwell, M. (2010, Februar). Fungal evolution and taxonomy. *BioControl*, 55 (1), 7–16. Zugriff am 2019-08-28 auf <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9243-8> doi: 10.1007/s10526-009-9243-8
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98 (3), 426–438. Zugriff am 2019-08-28 auf <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3732/ajb.1000298> doi: 10.3732/ajb.1000298
- Bland, J. M. & Altman, D. G. (2004, April). The logrank test. *BMJ*, 328 (7447), 1073. Zugriff am 2019-09-19 auf <https://www.bmj.com/content/328/7447/1073> doi: 10.1136/bmj.328.7447.1073
- Bogdan, C., Röllinghoff, M. & Diefenbach, A. (2000, Februar). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*, 12 (1), 64–76. Zugriff am 2019-09-16 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791599000527> doi: 10.1016/S0952-7915(99)00052-7
- Boguś, M. I., Kędra, E., Bania, J., Szczepanik, M., Czygier, M., Jabłoński, P., ... Polanowski, A. (2007, September). Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. *Journal of Insect Physiology*, 53 (9), 909–922. Zugriff am 2019-09-11 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191007000595> doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.02.016

- Boucias, D., Pendland, J. & Latge, J. (1988, August). Nonspecific Factors Involved in Attachment of Entomopathogenic Deuteromycetes to Host Insect Cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (7), 1795–805.
- Brown, H. A. & Khan, A. (2009). Pathogenicity and virulence of four isolates of *Metarhizium anisopliae* on selected natural enemies: *Cryptolaemus montrouzieri*, *Anagyrus kamali*, *Lysiphlebus testaceipes* and *Bracon thurberiphagae*. *Journal of Biopesticides*, 2 (2), 199–203. Zugriff auf <http://www.jbiopest.com>
- Brownbridge, M., Costa, S. & Jaronski, S. T. (2001, Mai). Effects of in Vitro Passage of *Beauveria bassiana* on Virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77 (4), 280–283. Zugriff am 2019-02-26 auf <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022201101950207> doi: 10.1006/jipa.2001.5020
- Butt, T. M., Coates, C. J., Dubovskiy, I. & Ratcliffe, N. (2016). Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. In *Advances in Genetics* (Bd. 94, S. 307–364). Elsevier. Zugriff am 2019-08-13 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065266016300062> doi: 10.1016/bs.adgen.2016.01.006
- Butt, T. M. & Goettel, M. S. (2000). Bioassays of entomogenous fungi. In A. Navon & K. R. S. Ascher (Hrsg.), *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. (S. 141–195). Wallingford: CABI Pub. Zugriff am 2019-02-07 auf <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20083014842> doi: 10.1079/9780851994222.0141
- Butt, T. M., Jackson, C. & Magan, N. (Hrsg.). (2001). *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford: CABI Pub. (OCLC: 248285160)
- Butt, T. M., Wang, C., Shah, F. A. & Hall, R. (2006). Degeneration of entomogenous fungi. In J. Eilenberg & H. Hokkanen (Hrsg.), *An Ecological and Societal Approach to Biological Control* (Bd. 2, S. 213–226). Dordrecht: Springer Netherlands. Zugriff am 2019-08-07 auf [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-4401-4\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-4401-4_10) doi: 10.1007/978-1-4020-4401-4\_10
- Carrillo, D., Dunlap, C. A., Avery, P. B., Navarrete, J., Duncan, R. E., Jackson, M. A., ... Peña, J. E. (2015, Februar). Entomopathogenic fungi as biological control agents for the vector of the laurel wilt disease, the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control*, 81, 44–50. Zugriff am 2019-10-10 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964414002175> doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.10.009
- Charnley, A. K. & Collins, S. A. (2007). Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. , *The Mycota IV*, 159–187. Zugriff auf [https://doi.org/10.1007/978-3-540-71840-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-71840-6_10) doi: 10.1007/978-3-540-71840-6\_10
- Choi, Y.-W., Hyde, K., Ho, W., Choi, Y. & Ho, A. (1999, Januar). Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity*, 3.
- Cito, A., Barzanti, G. P., Strangi, A., Francardi, V., Zanfini, A. & Dreassi, E. (2016, September). Cuticle-degrading proteases and toxins as virulence markers of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin: Proteases and toxins in *Beauveria bassiana* virulence mechanism. *Journal of Basic Microbiology*, 56 (9), 941–948. Zugriff am 2019-09-11 auf <http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.201600022> doi: 10.1002/jobm.201600022
- Clarkson, J. M. & Charnley, A. (1996, Mai). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4 (5), 197–203. Zugriff am 2019-09-05 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X96100226> doi: 10.1016/0966-842X(96)10022-6
- Dick, M. W. (2001). *Straminipilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes Including Accounts*

- of the Marine Straminipilous Protists, the Plasmodiophorids and Similar Organisms*. Springer Science & Business Media. Zugriff auf <https://doi.org/10.1007/978-94-015-9733-3> (Google-Books-ID: xkf8CAAAQBAJ)
- Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A. & Mueke, J. M. (2004, Februar). Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl*, 49 (1), 83–94. Zugriff am 2019-09-06 auf <http://link.springer.com/10.1023/B:BICO.0000009397.84153.79> doi: 10.1023/B:BICO.0000009397.84153.79
- Dubovskiy, I. M., Whitten, M. M. A., Yaroslavtseva, O. N., Greig, C., Kryukov, V. Y., Grizanov, E. V., ... Butt, T. M. (2013, April). Can Insects Develop Resistance to Insect Pathogenic Fungi? *PLoS ONE*, 8 (4). Zugriff am 2019-09-16 auf <https://doi.org/10.1371/annotation/3c61c1d6-7981-4f3e-a690-1ce7a4d89285> doi: 10.1371/journal.pone.0060248
- Eckard, S., Ansari, M. A., Bacher, S., Butt, T. M., Enkerli, J. & Grabenweger, G. (2014, Oktober). Virulence of in vivo and in vitro produced conidia of *Metarhizium brunneum* strains for control of wireworms. *Crop Protection*, 64, 137–142. Zugriff am 2019-10-07 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219414002026> doi: 10.1016/j.cropro.2014.06.017
- Eilenberg, J., Hajek, A. & Lomer, C. (2001, Dezember). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46 (4), 387–400. Zugriff am 2019-08-06 auf <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979> doi: 10.1023/A:1014193329979
- Eivazian Kary, N. & Alizadeh, Z. (2017, Mai). Effects of sub-culturing on genetic and physiological parameters in different *Beauveria bassiana* isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 145, 62–67. Zugriff am 2019-10-10 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201117301416> doi: 10.1016/j.jip.2017.03.008
- Erler, F. & Ates, A. O. (2015, April). Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Coleoptera: Scarabaeidae), as biological control agents against the June beetle. *Journal of Insect Science*, 15 (1). Zugriff am 2019-02-07 auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4535486/> doi: 10.1093/jisesa/iev029
- Fan, W., Idnurm, A., Breger, J., Mylonakis, E. & Heitman, J. (2007, Juli). Eca1, a Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, Is Involved in Stress Tolerance and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 75 (7), 3394–3405. Zugriff am 2019-09-26 auf <https://iai.asm.org/content/75/7/3394> doi: 10.1128/IAI.01977-06
- Faria, M. R. d. & Wraight, S. P. (2007, Dezember). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43 (3), 237–256. Zugriff am 2019-03-29 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964407001843> doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.08.001
- Fearon, D. T. (1997, Juli). Seeking wisdom in innate immunity. *Nature*, 388 (6640), 323–324. Zugriff am 2019-09-16 auf <https://www.nature.com/articles/40967> doi: 10.1038/40967
- Frazzon, A. P. G., Vaz Junior, I. d. S., Masuda, A., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2000, Dezember). In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94 (1), 117–125. Zugriff am 2019-09-30 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170000368X> doi: 10.1016/S0304-4017(00)00368-X
- Fuguet, R. & Vey, A. (2004, März). Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp.: in vivo studies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85 (3), 152–167. Zugriff am 2019-09-26 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002220110400028X> doi: 10.1016/j.jip.2004.03.001

- Gleason, F., Küpper, F., Amon, J., Picard, K., Gachon, C., Marano, A., ... Lilje, O. (2011, Mai). Zoosporic true fungi in marine ecosystems: A review. *Marine and Freshwater Research*, 62, 383–393. doi: 10.1071/MF10294
- Gleason, F. & Lilje, O. (2009, Mai). Structure and function of fungal zoospores: ecological implications. *Fungal Ecology*, 2 (2), 53–59. Zugriff am 2019-08-28 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S175450480800041X> doi: 10.1016/j.funeco.2008.12.002
- Goettel, M., Eilenberg, J. & Glare, T. (2005). Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations. In *Comprehensive Molecular Insect Science* (Bd. 6, S. 361–405). Elsevier. Zugriff am 2019-08-15 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0444519246000880> doi: 10.1016/B0-44-451924-6/00088-0
- Greenfield, B. P. J., Lord, A. M., Dudley, E. & Butt, T. M. (2014, Oktober). Conidia of the insect pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, fail to adhere to mosquito larval cuticle. *Royal Society Open Science*, 1 (2). Zugriff am 2019-09-06 auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4448906/> doi: 10.1098/rsos.140193
- Hadley, N. F. (1981). Cuticular Lipids of Terrestrial Plants and Arthropods: A Comparison of Their Structure, Composition, and Waterproofing Function. *Biological Reviews*, 56 (1), 23–47. Zugriff am 2019-09-10 auf <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-185X.1981.tb00342.x> doi: 10.1111/j.1469-185X.1981.tb00342.x
- Hajek, A. E., Papierok, B. & Eilenberg, J. (2012). Methods for study of the Entomophthorales. In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (S. 285–316). Elsevier. Zugriff am 2019-10-01 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123868992000099> doi: 10.1016/B978-0-12-386899-2.00009-9
- Hajek, A. E. & St. Leger, R. J. (1994, Januar). Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Annual Review of Entomology*, 39 (1), 293–322. Zugriff am 2019-08-15 auf <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.en.39.010194.001453> doi: 10.1146/annurev.en.39.010194.001453
- Hallsworth, J. E. & Magan, N. (1995, Mai). Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology*, 141 (5), 1109–1115. Zugriff am 2019-09-10 auf <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/13500872-141-5-1109> doi: 10.1099/13500872-141-5-1109
- Hallsworth, J. E. & Magan, N. (1996, Juli). Culture Age, Temperature, and pH Affect the Polyol and Trehalose Contents of Fungal Propagules. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (7), 2435–2442. Zugriff am 2019-09-10 auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388892/>
- Hallsworth, J. E. & Magan, N. (1999, November). Water and Temperature Relations of Growth of the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74 (3), 261–266. Zugriff am 2019-09-10 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022201199948838> doi: 10.1006/jipa.1999.4883
- Hemingway, J. (2018, Oktober). Resistance: A problem without an easy solution. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 151, 73–75. Zugriff am 2019-08-06 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357518302852> doi: 10.1016/j.pestbp.2018.08.007
- Henk, D. A. & Vilgalys, R. (2007). Molecular phylogeny suggests a single origin of insect symbiosis in the Pucciniomycetes with support for some relationships within the genus *Septobasidium*. *American Journal of Botany*, 94 (9), 1515–1526. Zugriff am 2019-08-29 auf <https://bsapubs>

- .onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3732/ajb.94.9.1515 doi: 10.3732/ajb.94.9.1515
- Hesketh, H., Roy, H. E., Eilenberg, J., Pell, J. K. & Hails, R. S. (2010, Februar). Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. *BioControl*, 55 (1), 55–73. Zugriff am 2019-09-05 auf <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9249-2> doi: 10.1007/s10526-009-9249-2
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... Zhang, N. (2007, Mai). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111 (5), 509–547. Zugriff am 2019-08-16 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756207000615> doi: 10.1016/j.mycres.2007.03.004
- Hirt, R., Logsdon, J., jr. Healy, B., W. Dorey, M., Ford Doolittle, W. & Martin Embley, T. (1999, Februar). Microsporidia Are Related to Fungi: Evidence from the Largest Subunit of RNA Polymerase II and Other Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 580–5. doi: 10.1073/pnas.96.2.580
- Holder, D. J. & Keyhani, N. O. (2005, September). Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to Substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 5260–5266. Zugriff am 2019-09-06 auf <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005> doi: 10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005
- Humber, R. A. (2008, Juli). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98 (3), 262–266. Zugriff am 2019-08-29 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201108000591> doi: 10.1016/j.jip.2008.02.017
- Humber, R. A. (2012a, Januar). Chapter X - Preservation of entomopathogenic fungal cultures. In L. A. Lacey (Hrsg.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)* (S. 317–328). San Diego: Academic Press. Zugriff am 2019-09-23 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123868992000105> doi: 10.1016/B978-0-12-386899-2.00010-5
- Humber, R. A. (2012b, September). Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. *Mycotaxon*, 120 (1), 477–492. Zugriff am 2019-08-29 auf <https://doi.org/10.5248/120.477> doi: 10.5248/120.477
- Hussain, A., Tian, M.-Y., He, Y.-R., Ruan, L. & Ahmed, S. (2010, 07). In vitro and in vivo culturing impacts on the virulence characteristics of serially passed entomopathogenic fungi. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 8, 481–487.
- Inglis, G. D., Enkerli, J. & Goettel, M. S. (2012). Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi. In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (S. 189–253). Elsevier. Zugriff am 2019-09-06 auf <https://doi.org/10.1016/C2010-0-66784-8> doi: 10.1016/B978-0-12-386899-2.00007-5
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M. & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In T. M. Butt, C. Jackson & N. Magan (Hrsg.), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (S. 23–69). Wallingford: CABI. Zugriff am 2019-09-06 auf <http://www.cabi.org/cabebbooks/ebook/20013125209> doi: 10.1079/9780851993560.0023
- Jaber, L. R. & Ownley, B. H. (2018, Januar). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, 116, 36–45. Zugriff am 2019-10-10 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964417300543> doi: 10.1016/j.biocontrol.2017.01.018
- Jager, K. J., van Dijk, P. C., Zoccali, C. & Dekker, F. W. (2008, September). The analysis of survival data: the Kaplan–Meier method. *Kidney International*, 74 (5), 560–565. Zugriff am 2019-09-19 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253815533681> doi:

10.1038/ki.2008.217

- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., ... Vilgalys, R. (2006, Oktober). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443 (7113), 818–822. Zugriff am 2019-08-29 auf <https://www.nature.com/articles/nature05110> doi: 10.1038/nature05110
- James, T. Y., Letcher, P. M., Longcore, J. E., Mozley-Standridge, S. E., Porter, D., Powell, M. J., ... Vilgalys, R. (2006, November). A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98 (6), 860–871. Zugriff am 2019-08-28 auf <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832616> doi: 10.1080/15572536.2006.11832616
- Jaronski, S. (2013, November). Mass Production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art. *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens*, 357–413. Zugriff auf <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00011-X> doi: 10.1016/B978-0-12-391453-8.00011-X
- Jaronski, S. & Mascarin, G. M. (2016, September). Mass Production of Fungal Entomopathogens. In *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice* (S. 141-155). Zugriff auf <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00009-3> doi: 10.1016/B978-0-12-803527-6.00009-3
- Jirakkakul, J., Roytrakul, S., Srisuksam, C., Swangmaneecharern, P., Kittisenachai, S., Jaresitthikunchai, J., ... Amnuaykanjanasin, A. (2018, Februar). Culture degeneration in conidia of *Beauveria bassiana* and virulence determinants by proteomics. *Fungal Biology*, 122 (2), 156–171. Zugriff am 2019-02-26 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614617301812> doi: 10.1016/j.funbio.2017.12.010
- Joshi, L., St. Leger, R. J. & Bidochka, M. J. (1995, Januar). Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 125 (2-3), 211–217. Zugriff am 2019-09-11 auf <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07360.x> doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07360.x
- Kamoun, S. (2003, April). Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell*, 2 (2), 191–199. Zugriff am 2019-08-28 auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154851/> doi: 10.1128/EC.2.2.191-199.2003
- Kavanagh, K. & Fallon, J. P. (2010, Februar). *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biology Reviews*, 24 (1), 79–83. Zugriff am 2019-09-26 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174946131000031X> doi: 10.1016/j.fbr.2010.04.001
- Kaya, H. K. & Vega, F. E. (2012). Chapter 1 - Scope and Basic Principles of Insect Pathology. In *Insect Pathology* (S. 1–12). Elsevier. Zugriff am 2019-08-01 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849847000014> doi: 10.1016/B978-0-12-384984-7.00001-4
- Keeling, P. J. & Fast, N. M. (2002, Februar). Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology*, 56, 93–116. Zugriff auf <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854> doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160854
- Keeling, P. J., Luker, M. A. & Palmer, J. D. (2000, Januar). Evidence from Beta-Tubulin Phylogeny that Microsporidia Evolved from Within the Fungi. *Molecular Biology and Evolution*, 17 (1), 23–31. Zugriff am 2019-08-27 auf <https://academic.oup.com/mbe/article/17/1/23/975522> doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026235

- Khosravi, R., Sendi, J. J., Zibae, A. & Shokrgozar, M. A. (2015, Januar). Virulence of four *Beauveria bassiana* (Balsamo) (Asc., Hypocreales) isolates on rose sawfly, *Arge rosae* under laboratory condition. *Journal of King Saud University - Science*, 27 (1), 49–53. Zugriff am 2019-07-18 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101836471400038X> doi: 10.1016/j.jksus.2014.04.003
- Kim, J. J. & Roberts, D. W. (2012, März). The relationship between conidial dose, moulting and insect developmental stage on the susceptibility of cotton aphid, *Aphis gossypii*, to conidia of *Lecanicillium attenuatum*, an entomopathogenic fungus. *Biocontrol Science and Technology*, 22 (3), 319–331. Zugriff am 2019-09-11 auf <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.656580> doi: 10.1080/09583157.2012.656580
- Kirk, P., Cannon, P., Stalpers, J. & Minter, D. (2008, Januar). Dictionary of the Fungi. 10th ed. *CABI Publishing. Great Britain*.
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M. & Goettel, M. S. (2015, November). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1–41. Zugriff am 2019-08-13 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201115001342> doi: 10.1016/j.jip.2015.07.009
- Lamour, K. & Kamoun, S. (2008). *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools*. John Wiley & Sons. doi: 10.1002/9780470475898
- Lavine, M. D. & Strand, M. R. (2002, Oktober). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32 (10), 1295–1309. Zugriff am 2019-09-16 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174802000929> doi: 10.1016/S0965-1748(02)00092-9
- Lee, S. C., Corradi, N., Doan, S., Dietrich, F. S., Keeling, P. J. & Heitman, J. (2010, Mai). Evolution of the sex-Related Locus and Genomic Features Shared in Microsporidia and Fungi. *PLOS ONE*, 5 (5), e10539. Zugriff am 2019-08-27 auf <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010539> doi: 10.1371/journal.pone.0010539
- Lemaitre, B. & Hoffmann, J. (2007, März). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25 (1), 697–743. Zugriff am 2019-09-16 auf <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615> doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615
- Lewis, M. W., Robalino, I. V. & Keyhani, N. O. (2009). Uptake of the fluorescent probe FM4-64 by hyphae and haemolymph-derived in vivo hyphal bodies of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 155 (9), 3110–3120. Zugriff am 2019-09-11 auf <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.029165-0> doi: 10.1099/mic.0.029165-0
- Liao, X., Lu, H.-L., Fang, W. & St. Leger, R. J. (2014, Januar). Overexpression of a *Metarhizium robertsii* HSP25 gene increases thermotolerance and survival in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (2), 777–783. Zugriff am 2019-10-01 auf <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5360-5> doi: 10.1007/s00253-013-5360-5
- Lichtwardt, R. W. (2002). Trichomycetes: Fungi in Relationship with Insects and Other Arthropods. In J. Seckbach (Hrsg.), *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems* (S. 575–588). Dordrecht: Springer Netherlands. Zugriff am 2019-08-29 auf [https://doi.org/10.1007/0-306-48173-1\\_36](https://doi.org/10.1007/0-306-48173-1_36) doi: 10.1007/0-306-48173-1\_36
- Lohmeyer, K. H. & Miller, J. A. (2007). Pathogenicity of Three Formulations of Entomopathogenic

- Fungi for Control of Adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 99 (6), 1943–7. doi: 10.1603/0022-0493-99.6.1943
- Lovett, B. & St. Leger, R. J. (2017, März). The Insect Pathogens. *Microbiology Spectrum*, 5 (2). Zugriff am 2019-09-11 auf <https://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.FUNK-0001-2016> doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0001-2016
- Lovett, B. & St. Leger, R. J. (2018). Genetically engineering better fungal biopesticides. *Pest Management Science*, 74 (4), 781–789. Zugriff am 2019-10-01 auf <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ps.4734> doi: 10.1002/ps.4734
- Lucarotti, C. J., Federici, B. & Chapman, H. (1985, Januar). Progress in the development of *Coelomomyces* fungi for use in integrated mosquito control programmes. In *Integrated mosquito control methodologies. Vol. 2* (S. 251–268). Academic Press London.
- Luz, C. & Fargues, J. (1997, Juni). Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia*, 138 (3), 117–125. Zugriff am 2019-09-10 auf <https://doi.org/10.1023/A:1006803812504> doi: 10.1023/A:1006803812504
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A. & Hakeem, K. R. (2015). Effects of Pesticides on Environment. In K. R. Hakeem, M. S. Akhtar & S. N. A. Abdullah (Hrsg.), *Plant, Soil and Microbes* (S. 253–269). Cham: Springer International Publishing. Zugriff am 2019-08-06 auf [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13) doi: 10.1007/978-3-319-27455-3\_13
- Marcus, R. & Eaves, D. (2000). Statistical and Computational Analysis of Bioassay Data. In A. Navon & K. R. S. Ascher (Hrsg.), *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. (S. 249–293). CABI Pub. doi: 10.1079/9780851994222.0249
- Mascarin, G. M. (2013, Mai). Precision micro-spray tower for application of entomopathogens. *BioAssay*, 8. Zugriff am 2019-10-10 auf <https://doi.org/10.14295/BA.v8.0.114>
- Mascarin, G. M., Kabori, N. N., Quintela, E. D. & Delalibera, I. (2013, September). The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. *Biological Control*, 66 (3), 209–218. Zugriff am 2019-02-26 auf <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.05.001> doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.05.001
- Meyling, N. V. & Pell, J. K. (2006). Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology*, 31 (2), 162–171. Zugriff am 2019-09-10 auf <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.0307-6946.2006.00781.x> doi: 10.1111/j.0307-6946.2006.00781.x
- Mohammadbeigi, A. (2013). Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Hymenoptera: Clavicipitaceae) passaged through artificial media and an insect host *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 6 (16), 1147–1152.
- Mora, M. A. E., Castilho, A. M. C. & Fraga, M. E. (2018, Januar). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico*, 84. Zugriff am 2019-08-29 auf <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000552015> doi: 10.1590/1808-1657000552015
- Mueller, U. G., Gerardo, N. M., Aanen, D. K., Six, D. L. & Schultz, T. R. (2005, Dezember). The Evolution of Agriculture in Insects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36 (1), 563–595. Zugriff am 2019-08-14 auf <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152626> doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152626



- Müller, T., Gesing, M. A., Segeler, M. & Müller, C. (2019, April). Sublethal insecticide exposure of an herbivore alters the response of its predator. *Environmental Pollution*, 247, 39–45. Zugriff am 2019-08-07 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749118351443> doi: 10.1016/j.envpol.2018.12.040
- Mustafa, S. (2016). Natural state of entomopathogenic fungi and the impact of their input on the biological control of cockchafer grubs (*Melolontha* sp.). , 56. (unveröffentlicht)
- Nahar, P. B., Kulkarni, S. A., Kulye, M. S., Chavan, S. B., Kulkarni, G., Rajendran, A., ... Deshpande, M. V. (2008, Januar). Effect of repeated in vitro sub-culturing on the virulence of *Metarhizium anisopliae* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, 18 (4), 337–355. Zugriff am 2019-09-23 auf <https://doi.org/10.1080/09583150801935650> doi: 10.1080/09583150801935650
- Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N. O. (2013, Juli). Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. *Insects*, 4 (3), 357–374. Zugriff am 2019-08-28 auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4553469/> doi: 10.3390/insects4030357
- Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N. O. (2015, August). Stress response signaling and virulence: insights from entomopathogenic fungi. *Current Genetics*, 61 (3), 239–249. Zugriff am 2019-07-19 auf <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0439-9> doi: 10.1007/s00294-014-0439-9
- Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N. O. (2016). Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects. In *Advances in Genetics* (Bd. 94, S. 165–249). Elsevier. Zugriff am 2019-09-30 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065266015000504> doi: 10.1016/bs.adgen.2015.11.003
- Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M. & Lomer, C. (1997, Januar). Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*, 137 (1), 37–43. Zugriff auf <https://doi.org/10.1023/A:1006882621776> doi: 10.1023/A:1006882621776
- Pedigo, L. P. & Rice, M. E. (2009). *Entomology and Pest Management: Sixth Edition*. Waveland Press. (Google-Books-ID: 6XvPBQAAQBAJ)
- Phillips, A. J., Anderson, V. L., Robertson, E. J., Secombes, C. J. & van West, P. (2008, Januar). New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology*, 16 (1), 13–19. Zugriff am 2019-08-27 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X07002454> doi: 10.1016/j.tim.2007.10.013
- Pocock, S. J., Clayton, T. C. & Altman, D. G. (2002, Mai). Survival plots of time-to-event outcomes in clinical trials: good practice and pitfalls. *The Lancet*, 359 (9318), 1686–1689. Zugriff am 2019-09-19 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067360208594X> doi: 10.1016/S0140-6736(02)08594-X
- Qu, S. & Wang, S. (2018, Juni). Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, 83, 96–103. Zugriff am 2019-08-13 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X17305542> doi: 10.1016/j.dci.2018.01.010
- Richards, T. A., Dacks, J. B., Jenkinson, J. M., Thornton, C. R. & Talbot, N. J. (2006, September). Evolution of Filamentous Plant Pathogens: Gene Exchange across Eukaryotic Kingdoms. *Current Biology*, 16 (18), 1857–1864. Zugriff am 2019-08-27 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982206019579> doi: 10.1016/j.cub.2006.07.052
- Roy, H. E., Vega, F. E., Chandler, D., Goettel, M. S., Pell, J. K., Wajnber, E. & Brodie, E. L. (2010). Deep space and hidden depths: understanding the evolution and ecology of fungal

- entomopathogens. *The ecology of fungal entomopathogens*, 55, 1–6. (OCLC: ocn645689225) doi: 10.1007/s10526-009-9244-7
- Safavi, S. (2012, Januar). Attenuation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* following serial in vitro transfers. *Biologia*, 67 (6). Zugriff am 2019-02-26 auf <https://doi.org/10.2478/s11756-012-0120-z> doi: 10.2478/s11756-012-0120-z
- Safavi, S. A. (2011, August). Successive subculturing alters spore-bound Pr1 activity, germination and virulence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 21 (8), 883–891. Zugriff am 2019-10-07 auf <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.588317> doi: 10.1080/09583157.2011.588317
- Safavi, S. A., Shah, F. A., Pakdel, A. K., Rasoulzadeh, G. R., Bandani, A. R. & Butt, T. M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270 (1), 116–123. Zugriff am 2019-09-10 auf <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1574-6968.2007.00666.x> doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00666.x
- Santi, L., Beys da Silva, W. O., Berger, M., Guimarães, J. A., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2010, April). Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55 (4), 874–880. Zugriff am 2019-09-11 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010109005819> doi: 10.1016/j.toxicon.2009.12.012
- Scholte, E.-J., Knols, B. G. J., Samson, R. A. & Takken, W. (2004, Januar). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, 4 (1). Zugriff am 2019-08-27 auf <https://academic.oup.com/jinsectscience/article/4/1/19/885790> doi: 10.1093/jis/4.1.19
- Schüssler, A., Schwarzott, D. & Walker, C. (2001, Dezember). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105 (12), 1413–1421. Zugriff am 2019-08-29 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953756208620262> doi: 10.1017/S0953756201005196
- Screen, S. E. & St. Leger, R. J. (2000, März). Cloning, expression, and substrate specificity of a fungal chymotrypsin. Evidence for lateral gene transfer from an actinomycete bacterium. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (9), 6689–94. Zugriff am 2019-09-11 auf <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6689> doi: 10.1074/jbc.275.9.6689
- Shah, F. A., Allen, N., Wright, C. J. & Butt, T. M. (2007, November). Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 276 (1), 60–66. Zugriff am 2019-09-30 auf <https://academic.oup.com/femsle/article/276/1/60/594561> doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00927.x
- Shah, F. A. & Butt, T. M. (2005, September). Influence of nutrition on the production and physiology of spores produced by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 250 (2), 201–207. Zugriff am 2019-10-08 auf <https://academic.oup.com/femsle/article/250/2/201/520418> doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.011
- Shah, F. A., Wang, C. S. & Butt, T. M. (2005, Oktober). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251 (2), 259–266. Zugriff am 2019-10-07 auf <https://academic.oup.com/femsle/article/251/2/259/601913> doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.010
- Shah, P. A. & Pell, J. K. (2003, Juni). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, 61 (5), 413–423. Zugriff am 2019-09-23 auf <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1240-8> doi: 10.1007/s00253-003-1240-8
- Shahid, A., Rao, Q., Bakhsh, A. & Husnain, T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*, 64 (1), 21–42. Zugriff am 2019-09-11 auf <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0354-46641201021S> doi: 10.2298/ABS1201021S
- Shapiro-Ilan, D. I., Fuxa, J. R., Lacey, L. A., Onstad, D. W. & Kaya, H. K. (2005, Januar). Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88 (1), 1–7. Zugriff am 2019-09-23 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201104001405> doi: 10.1016/j.jip.2004.10.003
- Skinner, M., Parker, B. L. & Kim, J. S. (2014, Januar). Chapter 10 - Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management. In D. P. Abrol (Hrsg.), *Integrated Pest Management* (S. 169–191). San Diego: Academic Press. Zugriff am 2019-08-06 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123985293000117> doi: 10.1016/B978-0-12-398529-3.00011-7
- Smietanko, A., Wiśniewski, J. & Cymborowski, B. (1989). Effect of low rearing temperature on development of *Galleria mellonella* larvae and their sensitivity to juvenilizing treatment. *Comp. Biochem. Physiol., Vol 92A* (2), 163–169. doi: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(89\)90147-3](https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90147-3)
- Smith, R. J. & Grula, E. A. (1981, Mai). Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37 (3), 222–230. Zugriff am 2019-09-09 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022201181900793> doi: 10.1016/0022-2011(81)90079-3
- Smits, N., Brière, J.-F. & Fargues, J. (2003, Dezember). Comparison of non-linear temperature-dependent development rate models applied to in vitro growth of entomopathogenic fungi. *Mycological Research*, 107 (12), 1476–1484. Zugriff am 2019-09-10 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095375620861357X> doi: 10.1017/S095375620300844X
- Solter, L. F., Becnel, J. J. & Oi, D. H. (2012, Januar). Chapter 7 - Microsporidian Entomopathogens. *Insect Pathology*, 221–263. Zugriff am 2019-08-27 auf <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849847000075> doi: 10.1016/B978-0-12-384984-7.00007-5
- St. Leger, R. J., Butt, T. M., Goettel, M. S., Staples, R. C. & Roberts, D. W. (1989, September). Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*, 13 (3), 274–288. Zugriff am 2019-09-10 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0147597589900492> doi: 10.1016/0147-5975(89)90049-2
- St. Leger, R. J., Butt, T. M., Staples, R. C. & Roberts, D. W. (1989, September). Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*, 13 (3), 253–262. Zugriff am 2019-09-10 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0147597589900479> doi: 10.1016/0147-5975(89)90047-9
- St. Leger, R. J., Frank, D. C., Roberts, D. W. & Staples, R. C. (1992, März). Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry*, 204 (3), 991–1001. Zugriff am 2019-09-11 auf <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16721.x> doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16721.x
- St. Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J. & Roberts, D. W. (1996, Juni). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America*, 93 (13), 6349–6354. Zugriff am 2019-10-01 auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC39025/> doi: 10.1073/pnas.93.13.6349
- Suh, S.-O., McHugh, J. V., Pollock, D. D. & Blackwell, M. (2005, März). The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycological Research*, 109 (3), 261–265. Zugriff am 2019-08-14 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953756208614112> doi: 10.1017/S0953756205002388
- Tahira, H., Saeed, S. & Khan, F. (2014, Juni). Entomopathogenic fungi as effective insect pest management tactic: a review. *Appl. Sci. Bus. Econ.*, 1 (1), 10–18.
- Tefera, T. & Pringle, K. (2003, November). Germination, Radial Growth, and Sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates and Their Virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at Different Temperatures. *Biocontrol Science and Technology*, 13 (7), 699–704. Zugriff am 2019-09-06 auf <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0958315031000151756> doi: 10.1080/0958315031000151756
- Theopold, U., Li, D., Fabbri, M., Scherfer, C. & Schmidt, O. (2002, Februar). The coagulation of insect hemolymph. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59 (2), 363–372. Zugriff am 2019-09-16 auf <http://link.springer.com/10.1007/s00018-002-8428-4> doi: 10.1007/s00018-002-8428-4
- Thomas, S. R. & Elkinton, J. S. (2004, März). Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85 (3), 146–151. Zugriff am 2019-08-01 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201104000072> doi: 10.1016/j.jip.2004.01.006
- Valero-Jiménez, C. A., Wieggers, H., Zwaan, B. J., Koenraadt, C. J. M. & van Kan, J. A. L. (2016, Januar). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133, 41–49. Zugriff am 2019-02-26 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201115300409> doi: 10.1016/j.jip.2015.11.011
- Vandenberg, J. D. & Cantone, F. A. (2004, Januar). Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth in vitro, virulence, and host specificity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85 (1), 40–45. Zugriff am 2019-09-30 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201103001939> doi: 10.1016/j.jip.2003.12.004
- Vega, F. & Dowd, P. F. (2005, Januar). The role of yeast as insect endosymbionts. In (S. 211–243).
- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J. & Blackwell, M. (2012, Januar). Chapter 6 - Fungal Entomopathogens. In F. E. Vega & H. K. Kaya (Hrsg.), *Insect Pathology (Second Edition)* (S. 171–220). San Diego: Academic Press. Zugriff am 2019-08-01 auf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849847000063> doi: 10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3
- Vyas, N., Dua, K. K. & Prakash, S. (2007, Juli). Efficacy of *Lagenidium giganteum* metabolites on mosquito larvae with reference to nontarget organisms. *Parasitology Research*, 101 (2), 385–390. Zugriff am 2019-08-27 auf <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0496-9> doi: 10.1007/s00436-007-0496-9
- Wanchoo, A., Lewis, M. W. & Keyhani, N. O. (2009). Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 155 (9), 3121–3133. Zugriff am 2019-09-11 auf <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.029157-0> doi: 10.1099/mic.0.029157-0
- Wang, C. & Wang, S. (2017). Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements. *Annual Review of Entomology*, 62 (1), 73–90. Zugriff am 2019-08-01 auf <https://>

- doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035509 doi: 10.1146/annurev-ento-031616-035509
- Watson, D. W. & Brandly, C. A. (1949, März). Virulence and Pathogenicity. *Annual Review of Microbiology* (3), 195–220. Zugriff auf <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.001211>
- White, M. M., James, T. Y., O'Donnell, K., Cafaro, M. J., Tanabe, Y. & Sugiyama, J. (2006, November). Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*, 98 (6), 872–884. Zugriff am 2019-08-29 auf <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832617> doi: 10.1080/15572536.2006.11832617
- White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols* (S. 315–322). Elsevier. Zugriff am 2019-09-23 auf <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123721808500421> doi: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
- Zhang, Y.-J., Feng, M.-G., Fan, Y.-H., Luo, Z.-B., Yang, X.-Y., Wu, D. & Pei, Y. (2008, Januar). A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* enhances virulence. *Biocontrol Science and Technology*, 18 (6), 543–555. Zugriff am 2019-09-11 auf <https://doi.org/10.1080/09583150802082239> doi: 10.1080/09583150802082239
- Zimmermann, G. (1986, Januar). The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102 (1-5), 213–215. Zugriff am 2019-02-07 auf <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0418.1986.tb00912.x> doi: 10.1111/j.1439-0418.1986.tb00912.x
- Zimmermann, G. (2007a, Juni). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17 (6), 553–596. Zugriff am 2019-08-31 auf <https://doi.org/10.1080/09583150701309006> doi: 10.1080/09583150701309006
- Zimmermann, G. (2007b, Oktober). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17 (9), 879–920. Zugriff am 2019-08-31 auf <https://doi.org/10.1080/09583150701593963> doi: 10.1080/09583150701593963
- Zimmermann, G. (2008, Dezember). The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*, 18 (9), 865–901. Zugriff am 2019-08-31 auf <https://doi.org/10.1080/09583150802471812> doi: 10.1080/09583150802471812

# Abbildungsverzeichnis

- 1 Eine schematische Darstellung der Beziehungen zwischen den Pilz-Taxa nach Blackwell (2011) und Hibbett et al. (2007) und der ungefähren Anzahl Arten in jeder Gruppe (Kirk et al., 2008). Darstellung aus F. E. Vega et al. (2012), unverändert. . . . . 13
- 2 Aufwärtsdrehung des filamentösen Schlauches bei der Sporenkeimung. (A) Bildet die ruhende Spore ab: der filamentöse Schlauch (schwarz), der Nucleus (grau), Polaroplast und die hinten gelegene Vakuole. (B) Schwellung des Polaroplast und der Vakuole, einschliesslich des Bruches der Verankerungsscheibe und dem beginnenden Austritt und der Aufwärtsdrehung des filamentösen Schlauches. (C) Weiteres Aufdrehen des Schlauches. (D, E) Bei vollständig umgestülpten Schlauch wird das Sporoplasma in und durch den Schlauch gedrückt. (F) Das Sporoplasma entweicht aus dem durch eine neue Membran gebundenen Schlauch. Aus Keeling und Fast (2002), unverändert. . . . . 15
- 3 Generisches Modell, dass den Infektionsprozess entomopathogener Pilze zeigt. Eine infektiöse Spore haftet an der Kutikula eines Insekts. Sie bildet einen Keimschlauch (und Appressorium) aus, der mit einer Hyphe die Schichten der Kutikula durchdringt. Ist das Hämocoel erreicht bilden sich in vivo Blastosporen oder Hyphenkörper. Das Pilzwachstum setzt sich fort, dringt in Organe ein, stört Stoffwechselprozesse oder produziert toxische Metaboliten, die unter Umständen zum Tod des Wirtes führen können (aus F. E. Vega et al. (2012), unverändert). . . . . 21
- 4 Planimeter (*Planix5*) befestigt auf einer schwarzen Holzplatte mit einem Halterungsloch für 90mm Petrischalen. Bild: A. Rutzer 33
- 5 Unterschiedlicher Erfolg beim Erstellen reiner Subkulturen mit nur einem Wachstumszentrum. Hier abgebildet sind die beiden Pilzstämme von *M. anisoliae* (oben: *Metarhizium Schweiz* - CM F1\_21.04.16\_5116 der Agroscope, unten: KT583222) nach fünfmaligem Subkultivieren. Bild: A. Rutzer . . . . . 34

6	Veränderungen der Wachstumsflächen mit Boxplots visualisiert. In Rot dargestellt, ist die jeweilige Regressionsanalyse mit zugehörigem P-Wert (links der Graphiken). Die Variable <i>n</i> beschreibt die Anzahl Wiederholungen. Die in Klammern gesetzte Nummern entsprechen der Mykothek-Nummer der ZHAW Wädenswil (vgl. Tabelle 2, S. 32). . . . .	42
7	Vergleich aller drei Überlebenswahrscheinlichkeitskurven. Errechnet mit dem Kaplan-Meier-Modell. Bildbeschreibung auf der nächsten Seite. . . . .	44
8	Eine Kultur von <i>M. anisopliae</i> (Stamm V 275) auf PDA (eng. poato dextrose agar). Gut erkennbar ist der typisch V-förmige Sektor mit spärlichem Wachstum und verringerter Sporulation (Pfeil) im Vergleich zur Hauptkultur. Aus F. A. Shah und Butt (2005), unverändert. . . . .	47
9	Vergleich der Kontrollgruppen zur Nachvollziehbarkeit der minderen Qualität der Insekten bei der letzten Mortalitätsanalyse. Von links nach rechts: 2., 5. und 10. Subkultur. Die Bilder stammen vom zwölften Versuchstag. 2. Subkultur: drei verpuppende und zwei tot, 5. Subkultur: vier sich verpuppend und 10. Subkultur: drei verendet an einem natürlichen Tod und acht sich verpuppend, wobei gerade eine Larve ihr natürlich elfenbeinfarbenes Aussehen bis zum Ende des Versuches behielt. Bild: A. Rutzer. . . . .	51
B.1	Auswertung der <i>B. bassiana</i> (Mykothek-Nr. 6) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell . . . . .	VI
B.2	Auswertung der <i>B. bassiana</i> (Mykothek-Nr. 19) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell . . . . .	VII
B.3	Auswertung der <i>M. anisopliae</i> (Mykothek-Nr. 74) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell . . . . .	VIII
B.4	Auswertung der <i>M. anisopliae</i> (Mykothek-Nr. 125) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell . . . . .	IX
B.5	Auswertung der <i>M. brunneum</i> (Mykothek-Nr. 36) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell . . . . .	X

B.6	Auswertung der <i>M. brunneum</i> (Mykothek-Nr. 115) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell . . . . .	XI
B.7	Auswertung der <i>M. robertsii</i> (Mykothek-Nr. 40) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell . . . . .	XII
B.8	Auswertung der <i>M. robertsii</i> (Mykothek-Nr. 75) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell . . . . .	XIII
B.9	Auswertung der <i>I. fumosorosea</i> (Mykothek-Nr. 138) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell . . . . .	XIV



## Tabellenverzeichnis

1	Die Suffixe der taxonomischen Gruppierungen nach Hibbett et al. (2007) . . . . .	14
2	Informationen zu den untersuchten EPF. Erfasst in der Mykothek der ZHAW Wädenswil. . . . .	32
3	Eingestellte Konzentration der Sporenlösungen für den Mortalitätstest . . . . .	35
4	Chronologische Abbildung der Infektionsvorgänge während der Mortalitätsanalyse der 2. Subkultur von <i>B. bassiana</i> (Mykothek-Nr. 19) und <i>M. robertsii</i> (Mykothek-Nr. 75), in den Bildern jeweils links abgebildet. Dem gegenüber sind auf der rechten Hälfte aller Bilder Beispiele für den Verlauf eines «natürlich» eintretenden Todes abgelichtet. . . . .	37
5	Tabellarische Darstellung für den Vergleich der Morphologie der 2. und 10. Subkultur. Die Kulturen waren bei den Fotoaufnahmen zwei Wochen alt. Um allfällige Veränderungen besser nachvollziehen zu können wurden in der linken Spalte die Originalkulturen abgebildet. In dieser Spalte sind Original-Kulturen auf dem Petrischalen-Deckel, in den jeweiligen Bildern rechts. Auf der linken Seite dieser Bilder ist die 1. Subkultur im Alter von vier Wochen abgebildet. Bilder: A. Rutzer. . . . .	40
6	Anzahl isolierter Sporen vor dem Einstellen auf eine gleichmässige Anzahl Sporen für die anschliessend verwendete Suspension. .	43
7	Tabellarische Darstellung der geschätzten $LT_{50}$ der Abbildung 7 zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen.	46
8	In dieser Tabelle sind die Zahlenwerte aus Abbildung 7 dargestellt und sollen ihre die Nachvollziehbarkeit verbessern. Die Werte sind auf drei Kommastellen gerundet. . . . .	46

9	Tabellarische Übersicht pro Pilzstamm, ob Veränderungen in Phänotyp, Wachstumsrate und Virulenz nachgewiesen wurden. Zusätzlich ist der $LT_{50}$ der Analysen mit der 2. Subkultur abgebildet. Die « <b>fett</b> » markierten Pilzstämme werden für weitere Untersuchungen empfohlen. . . . .	53
A.1	Auflistung der benötigten Materialien für die Herstellung des Nährmediums Corn Steep Agar. . . . .	I
B.1	Tabellarische Darstellung der geschätzten $LT_{50}$ der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen. . . . .	VI
B.2	Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF <i>B. bassiana</i> (Mykothek-Nr.6). . . . .	VI
B.3	Tabellarische Darstellung der geschätzten $LT_{50}$ der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen. . . . .	VII
B.4	Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF <i>B. bassiana</i> (Mykothek-Nr.19). . . . .	VII
B.5	Tabellarische Darstellung der geschätzten $LT_{50}$ der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen. . . . .	VIII
B.6	Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF <i>M. anisopliae</i> (Mykothek-Nr. 74). . . . .	VIII
B.7	Tabellarische Darstellung der geschätzten $LT_{50}$ der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen. . . . .	IX
B.8	Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF <i>M. anisopliae</i> (Mykothek-Nr. 125). . . . .	IX

B.9	Tabellarische Darstellung der geschätzten $LT_{50}$ der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen. . . . .	X
B.10	Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF <i>M. brunneum</i> (Mykothek-Nr. 36). . . . .	X
B.11	Tabellarische Darstellung der geschätzten $LT_{50}$ der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen. . . . .	XI
B.12	Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF <i>M. brunneum</i> (Mykothek-Nr. 115). . . . .	XI
B.13	Tabellarische Darstellung der geschätzten $LT_{50}$ der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen. . . . .	XII
B.14	Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF <i>M. robertsii</i> (Mykothek-Nr. 40). . . . .	XII
B.15	Tabellarische Darstellung der geschätzten $LT_{50}$ der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen. . . . .	XIII
B.16	Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF <i>M. robertsii</i> (Mykothek-Nr. 75). . . . .	XIII
B.17	Tabellarische Darstellung der geschätzten $LT_{50}$ der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen. . . . .	XIV
B.18	Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF <i>I. fumosorosea</i> (Mykothek-Nr. 138). . . . .	XIV

## Appendix A: Verfahren

### A.1 Rezept Corn Steep Agar

Rezept nach Ursula Löffel (Mitarbeiterin ZHAW, Leitung Labore)

Tabelle A.1: Auflistung der benötigten Materialien für die Herstellung des Nährmediums Corn Steep Agar.

Menge	Material	Sigma	CAS
10g	Corn Steep solids	Art.C8160	/
15g	Saccharose	Art.S937	57-50-1
1.9g	Sodium phosphate dibasic Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Art.S5136	7558-79-4
1.13g	Potassium phosphate monobasic KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P5655	7778-77-0
6g	Agar	A7002	9002-18-0

Die Bestandteile mit 500 mL Leitungswasser in eine 1000 mL Schottflasche einwiegen, rühren und direkt in der Flasche 15 min lang bei 121 °C autoklavieren.

## A.2 Berechnungsformel Neubauer-Zählkammer

Formel:

$$\frac{(\text{ausgezählte Zellen})}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung (mL)}} = \text{Zellen}/\mu\text{L}$$

Einzusetzende Werte:

- 30 ausgezählte Sporen
- Ausgezählte Fläche:  $5 * 0.04\text{mm}^2 = 0.2\text{mm}^2$
- Kammertiefe: 0.1 mm
- Verdünnung: keine

Resultat im Versuch:

$$\frac{30}{0.2\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm}} = 1500 \text{ Sporen}/\mu\text{L}$$

### A.3 R Skript

#### Plot für Pilzwachstum (R-Skript eines Pilzes)

```
par(mfrow=c(3,3), mar=c(2.4,4.7,4,1.9), oma=c(0,0,1,0))
```

*#—> um alle Plots auf eine Seite zu bekommen*

```
P_006 <- {
  boxplot(A_006$Flaeche~A_006$Subkultur, at=c(1,5,10),
  names=c("2. Subkultur", "5. Subkultur", "10. Subkultur"),
  ylim=c(0,63.617), outline = FALSE, main="B. bassiana (6)",
  outer=TRUE, cex.main=1.2,
  ylab=expression("Wachstumsflaeche" ~ ( ~ cm2 ~ " ")))

  axis(3, at=c(1,5,10), labels = c("n=4", "n=10", "n=8"),
  tick=FALSE, cex=0.5, line = -0.8)

  t_006=lm(A_006$Flaeche~A_006$Subkultur)
  abline(t_006, lwd=2, col= 2)
  summary(t_006) # —> p-value

  mtext("p= . . . . .", 4, font = 3, col = 2, at = 16, cex = 0.7 )

  stripchart(A_006$Flaeche~A_006$Subkultur,
  add= TRUE, vertical=TRUE, at=c(1,5,10),
  method="jitter", jitter=0.3, pch=1)
}
```

## Plot Kaplan-Meier-Modell

```

a <- read.csv("KM_Alles.csv", sep=";")
attach(a)

fita <- survfit(Surv(a$time, a$death) ~ a$Pilz, data = a)
ggsurvplot(
  fita,
  data = a,
  fun = "pct",
  title = "Veränderung der Virulenz durch serielle Subkultivierung",
  xlab = "Tage",
  xlim = c(0, 12),
  ylab = "Überlebenswahrscheinlichkeit (%)",
  palette = "uchicago",
  ggtheme = theme_bw(),
  linetype = c("longdash", "dotted", "twodash"),
  break.time.by = 1,
  conf.int = TRUE,
  conf.int.style = "ribbon",
  conf.int.alpha = 0.15,
  censor = TRUE,
  censor.shape = 4,
  pval = TRUE,
  pval.coord = c(0, 1.7),
  legend = "top",
  legend.title = "",
  legend.labs = c("Subk. 02", "Subk. 05", "Subk. 10"),
  #legend.labs = c("", "", "")

```

```

risk.table = "abs_pct",
risk.table.title =
"    überlebende    Individuen zum Zeitpunkt t: n(%)",
cumevents = TRUE,
cumevents.title =
"Anzahl kumulativer Tode zum Zeitpunkt t",
tables.height = 0.2,
tables.theme = theme_bw(),
tables.y.text = FALSE,
tables.x.text = FALSE,

surv.median.line = "hv,

log.rank.weights="1"
)

summary(fita)
surv_summary(fita, data=a)

#gesch tzer LT50
survfit(formula=Surv(a$time, a$death)~a$Pilz,
data=a, type="kaplan-meier", conf.type="log")

```



# Appendix B: Rohdaten aus dem Kaplan-Meier-Modell

## *B. bassiana* (Mykothek-Nr. 6)

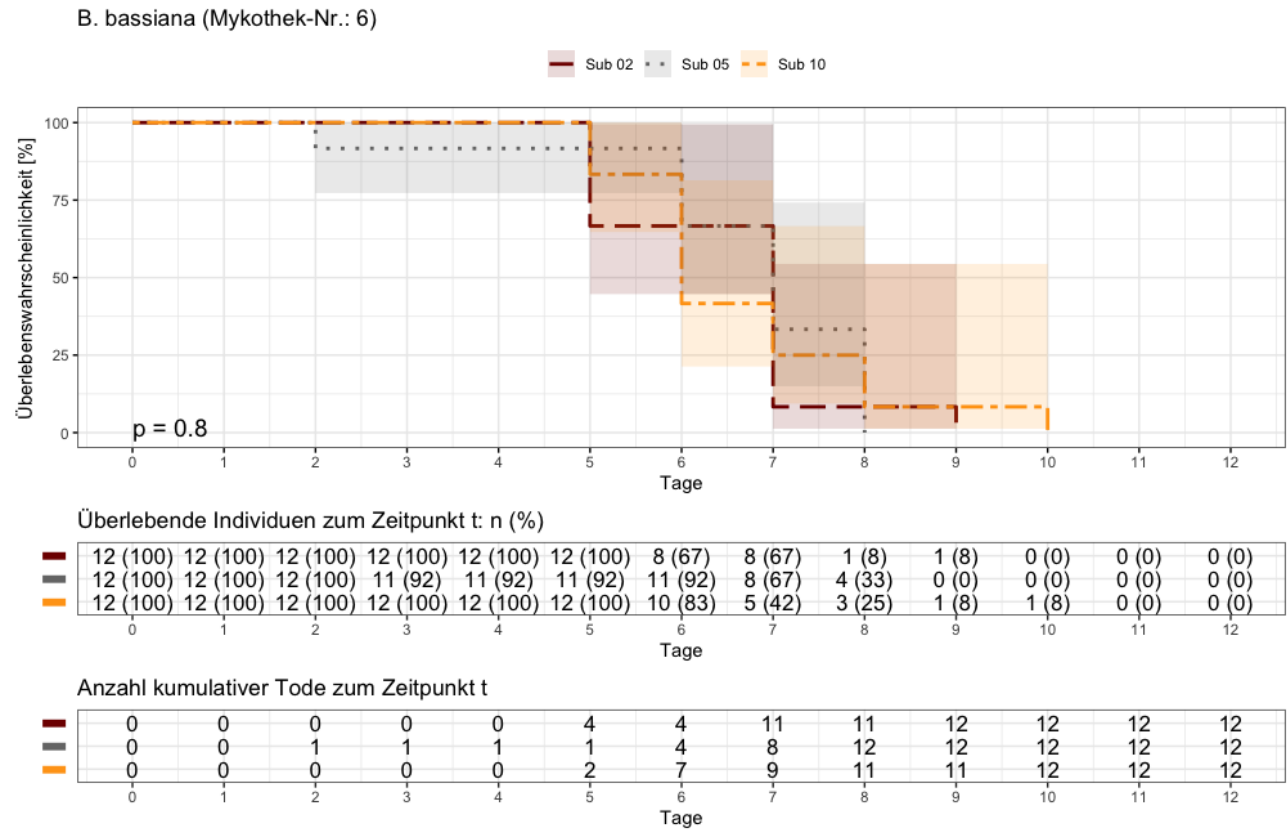


Abbildung B.1: Auswertung der *B. bassiana* (Mykothek-Nr. 6) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell

Tabelle B.1: Tabellarische Darstellung der geschätzten  $LT_{50}$  der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen.

Subkultur	Anzahl Larven Beginn	Tode durch Pilzinfektion	Median ( $LT_{50}$ )	Unteres 95% Konfidenz-Level	Oberes 95% Konfidenz-Level
2.	12	12	7	5	NA
5.	12	12	7	6	NA
10.	12	12	6	6	NA

Tabelle B.2: Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF *B. bassiana* (Mykothek-Nr.6).

	Tag	Überlebende Individuen	Tode	Zensierte Daten	Überlebens- wahrscheinlichkeit	Standard- fehler	Oberes 95% Konf-Int.	Unteres 95% Konf-Int.
2. Subkultur	5	12	4	0	0.667	0.204	0.995	0.447
	7	8	7	0	0.083	0.957	0.544	0.013
	9	1	1	0	0.000	Inf	NA	NA
5. Subkultur	2	12	1	0	0.917	0.087	1.000	0.773
	6	11	3	0	0.667	0.204	0.995	0.447
	7	8	4	0	0.333	0.408	0.742	0.150
10. Subkultur	8	4	4	0	0.000	Inf	NA	NA
	5	12	2	0	0.833	0.129	1.000	0.647
	6	10	5	0	0.417	0.342	0.814	0.213
	7	5	2	0	0.250	0.500	0.666	0.094
	8	3	2	0	0.083	0.957	0.544	0.127
	10	1	1	0	0.000	Inf	NA	NA

B. bassiana (Mykothek-Nr. 19)

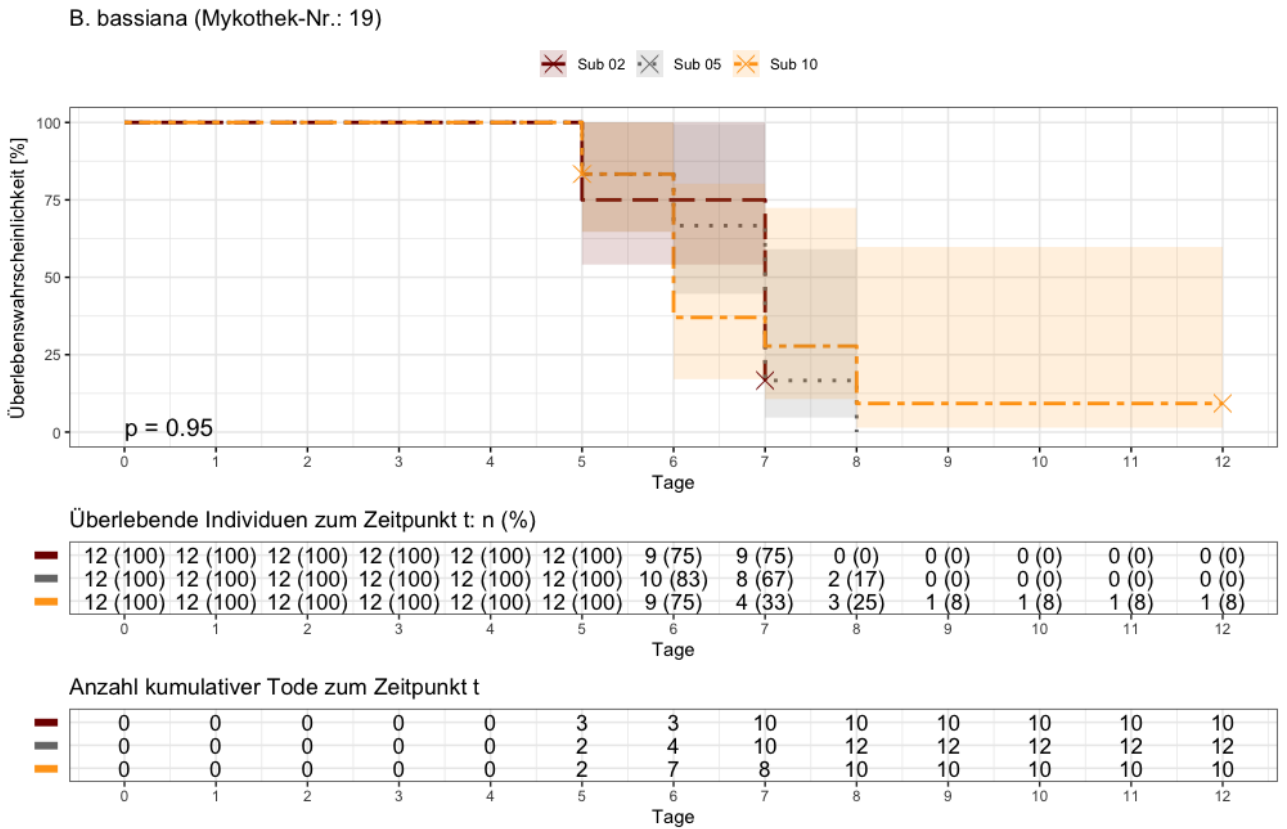


Abbildung B.2: Auswertung der *B. bassiana* (Mykothek-Nr. 19) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell

Tabelle B.3: Tabellarische Darstellung der geschätzten LT<sub>50</sub> der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen.

Subkultur	Anzahl Larven Beginn	Tode durch Pilzinfektion	Median (LT <sub>50</sub> )	Unteres 95% Konfidenz-Level	Oberes 95% Konfidenz-Level
2.	12	12	7	7	NA
5.	12	12	7	6	NA
10.	12	10	6	6	NA

Tabelle B.4: Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF *B. bassiana* (Mykothek-Nr.19).

	Tag	Überlebende Individuen	Tode	Zensierte Daten	Überlebens- wahrscheinlichkeit	Standard- fehler	Oberes 95% Konf-Int.	Unteres 95% Konf-Int.
2. Subkultur	5	12	3	0	0.750	0.167	1.000	0.541
	7	9	7	2	1.667	0.645	0.590	0.047
5. Subkultur	2	12	2	0	0.833	0.129	1.000	0.647
	6	10	2	0	0.667	0.204	0.995	0.447
	7	8	6	0	0.167	0.646	0.591	0.047
	8	2	2	0	0.000	Inf	NA	NA
10. Subkultur	5	12	2	1	0.833	0.129	1.000	0.647
	6	9	5	0	0.370	0.394	0.802	0.171
	7	4	1	0	0.278	0.489	0.724	0.107
	8	3	2	0	0.093	0.952	0.598	0.014
	10	1	0	1	0.093	0.952	0.598	0.014

*M. anisopliae* (Mykothek-Nr. 74)

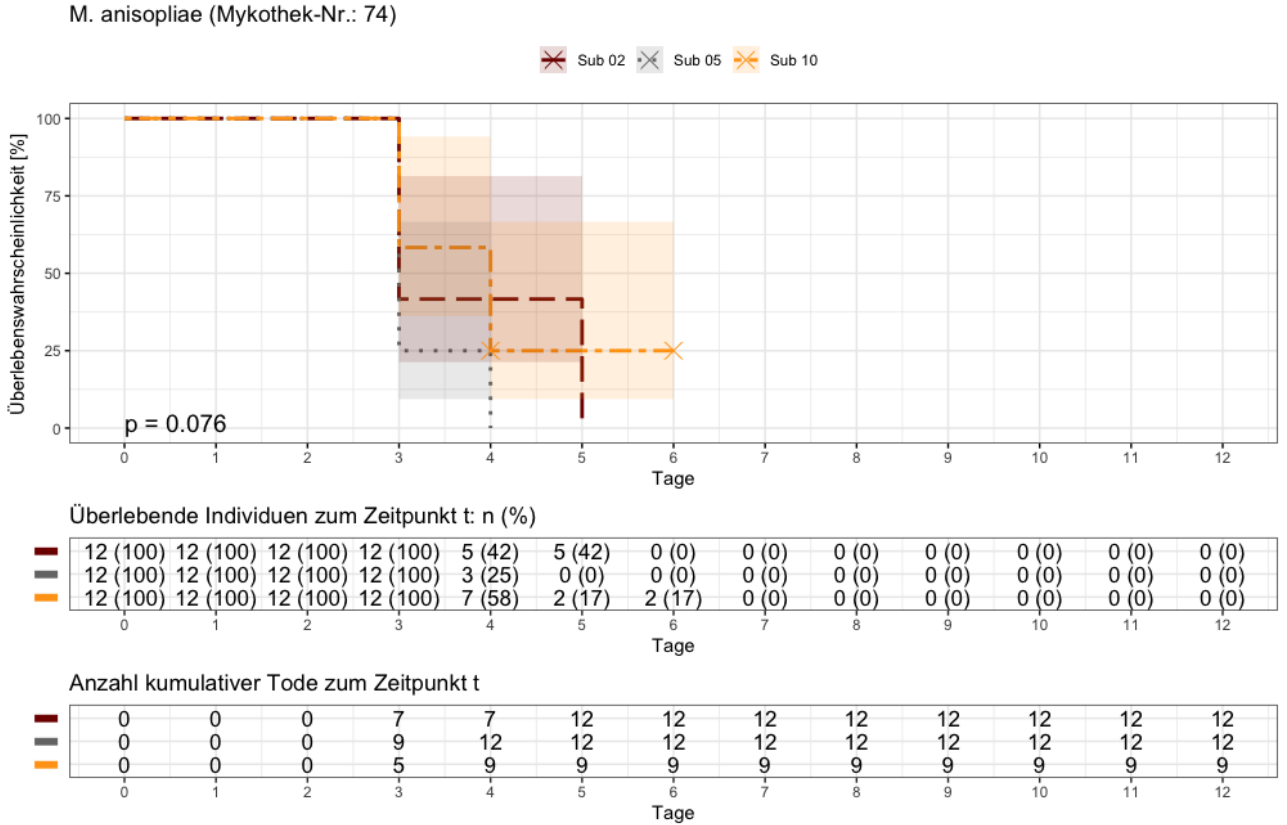


Abbildung B.3: Auswertung der *M. anisopliae* (Mykothek-Nr. 74) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell

Tabelle B.5: Tabellarische Darstellung der geschätzten LT<sub>50</sub> der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen.

Subkultur	Anzahl Larven Beginn	Tode durch Pilzinfektion	Median (LT <sub>50</sub> )	Unteres 95% Konfidenz-Level	Oberes 95% Konfidenz-Level
2.	12	12	6	3	NA
5.	12	12	3	3	NA
10.	12	9	3	3	NA

Tabelle B.6: Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF *M. anisopliae* (Mykothek-Nr. 74).

	Tag	Überlebende Individuen	Tode	Zensierte Daten	Überlebens- wahrscheinlichkeit	Standard- fehler	Oberes 95% Konf-Int.	Unteres 95% Konf-Int.
2. Subkultur	3	12	7	0	0.417	0.342	0.814	0.213
	5	5	5	0	0.000	Inf	NA	NA
5. Subkultur	3	12	9	0	0.250	0.500	0.666	0.094
	4	3	3	0	0.000	Inf	NA	NA
10. Subkultur	3	12	5	0	0.582	0.244	0.901	0.362
	4	7	4	1	0.250	0.666	0.666	0.094
	6	2	0	2	0.250	0.666	0.666	0.094

## *M. anisopliae* (Mykothek-Nr. 125)

*M. anisopliae* (Mykothek-Nr.: 125)

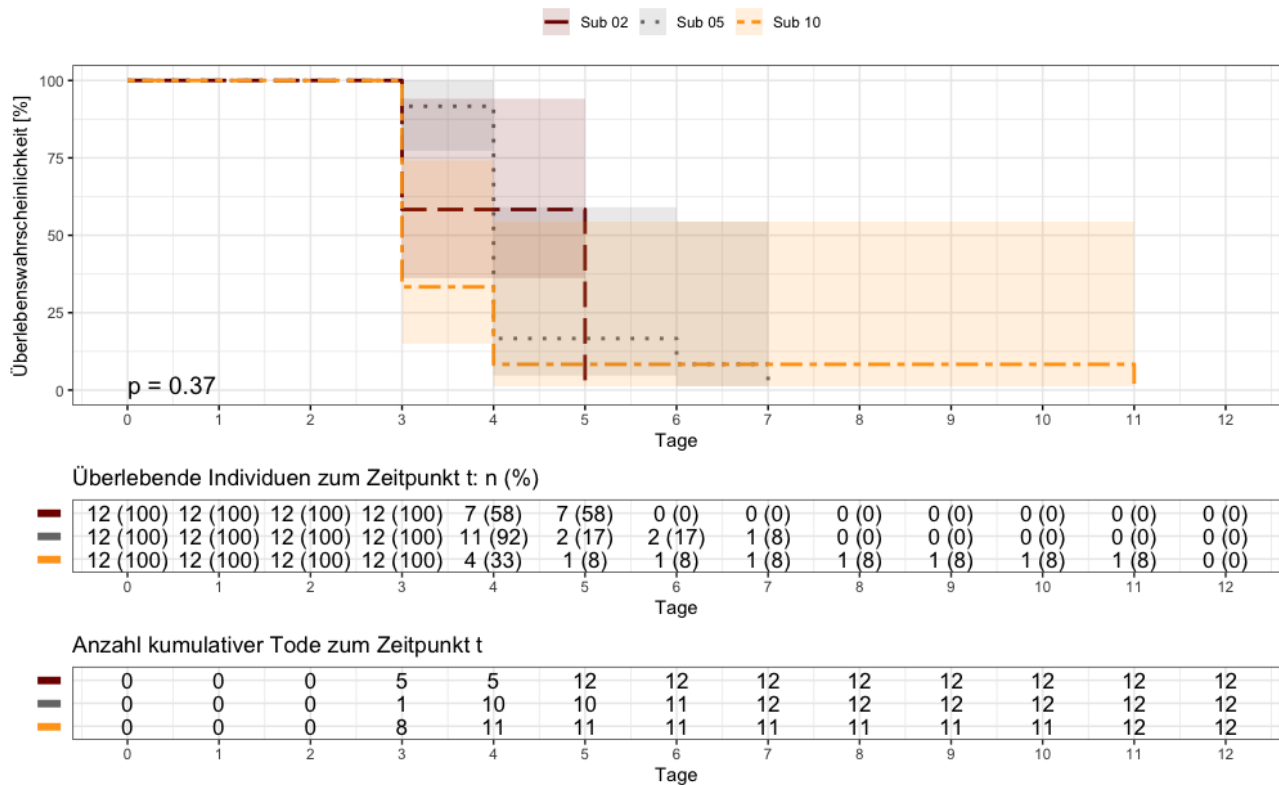


Abbildung B.4: Auswertung der *M. anisopliae* (Mykothek-Nr. 125) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell

Tabelle B.7: Tabellarische Darstellung der geschätzten  $LT_{50}$  der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen.

Subkultur	Anzahl Larven Beginn	Tode durch Pilzinfektion	Median ( $LT_{50}$ )	Unteres 95% Konfidenz-Level	Oberes 95% Konfidenz-Level
2.	12	12	5	3	NA
5.	12	12	4	4	NA
10.	12	12	3	3	NA

Tabelle B.8: Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF *M. anisopliae* (Mykothek-Nr. 125).

	Tag	Überlebende Individuen	Tode	Zensierte Daten	Überlebens- wahrscheinlichkeit	Standard- fehler	Oberes 95% Konf-Int.	Unteres 95% Konf-Int.
2. Subkultur	5	12	5	0	0.583	0.240	0.941	0.362
	7	7	7	0	0.000	Inf	NA	NA
5. Subkultur	3	12	1	0	0.917	0.087	1.000	0.773
	4	11	9	0	0.167	0.646	0.591	0.047
	6	2	1	0	0.083	0.957	0.544	0.012
	7	1	1	0	0.000	Inf	NA	NA
10. Subkultur	5	12	8	0	0.333	0.408	0.742	0.150
	6	4	3	0	0.083	0.957	0.544	0.013
	7	1	1	0	0.000	Inf	NA	NA

## *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 36)

*M. brunneum* (Mykothek-Nr.: 36)

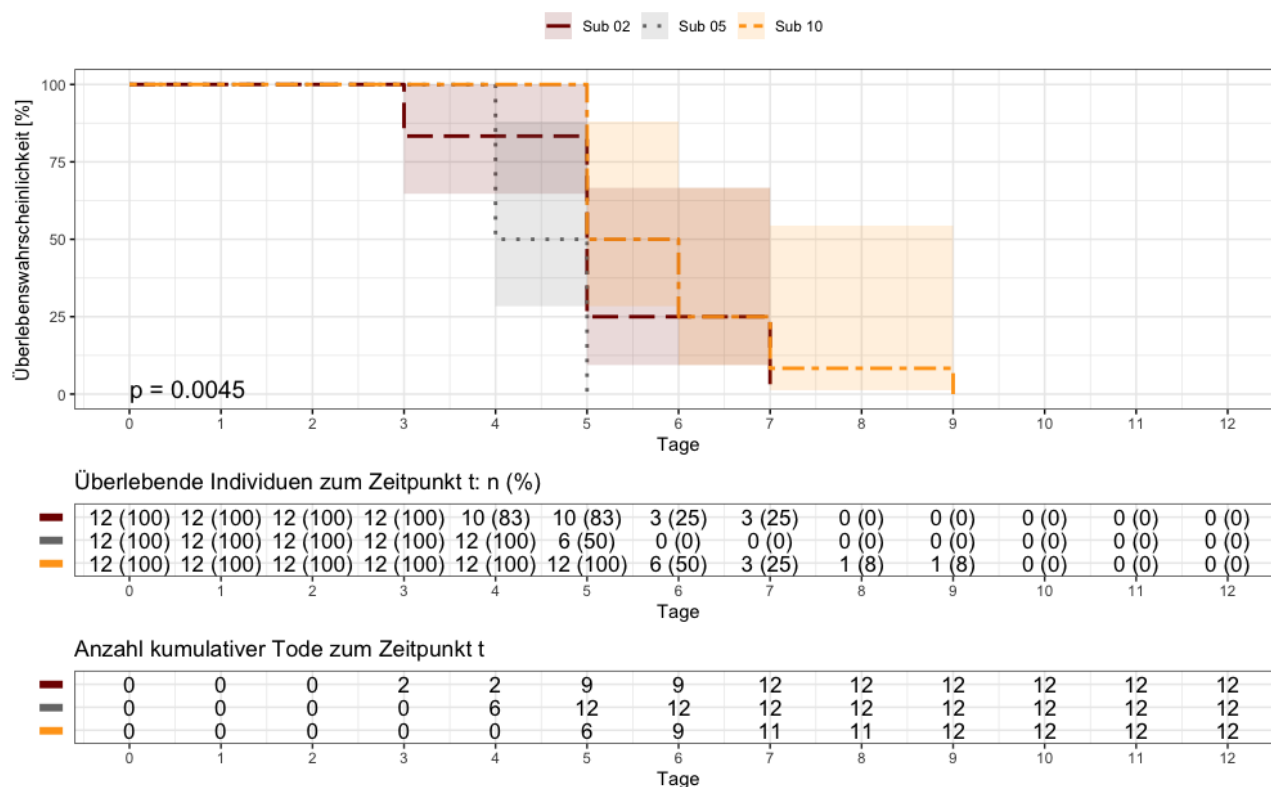


Abbildung B.5: Auswertung der *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 36) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell

Tabelle B.9: Tabellarische Darstellung der geschätzten  $LT_{50}$  der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen.

Subkultur	Anzahl Larven Beginn	Tode durch Pilzinfektion	Median ( $LT_{50}$ )	Unteres 95% Konfidenz-Level	Oberes 95% Konfidenz-Level
2.	12	12	5	5	NA
5.	12	12	4.5	4	NA
10.	12	12	5.5	5	NA

Tabelle B.10: Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 36).

	Tag	Überlebende Individuen	Tode	Zensierte Daten	Überlebens- wahrscheinlichkeit	Standard- fehler	Oberes 95% Konf-Int.	Unteres 95% Konf-Int.
2. Subkultur	3	12	2	0	0.833	0.129	1.000	0.647
	5	10	7	0	0.250	0.500	0.666	0.094
	7	3	3	0	0.000	Inf	NA	NA
5. Subkultur	4	12	6	0	0.500	0.289	0.880	0.284
	5	6	6	0	0.000	Inf	NA	NA
10. Subkultur	5	12	6	0	0.500	0.289	0.880	0.284
	6	6	3	0	0.250	0.500	0.666	0.094
	7	3	2	0	0.833	0.957	0.544	0.012
	9	1	1	0	0.000	Inf	NA	NA

## *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 115)

*M. brunneum* (Mykothek-Nr.: 115)

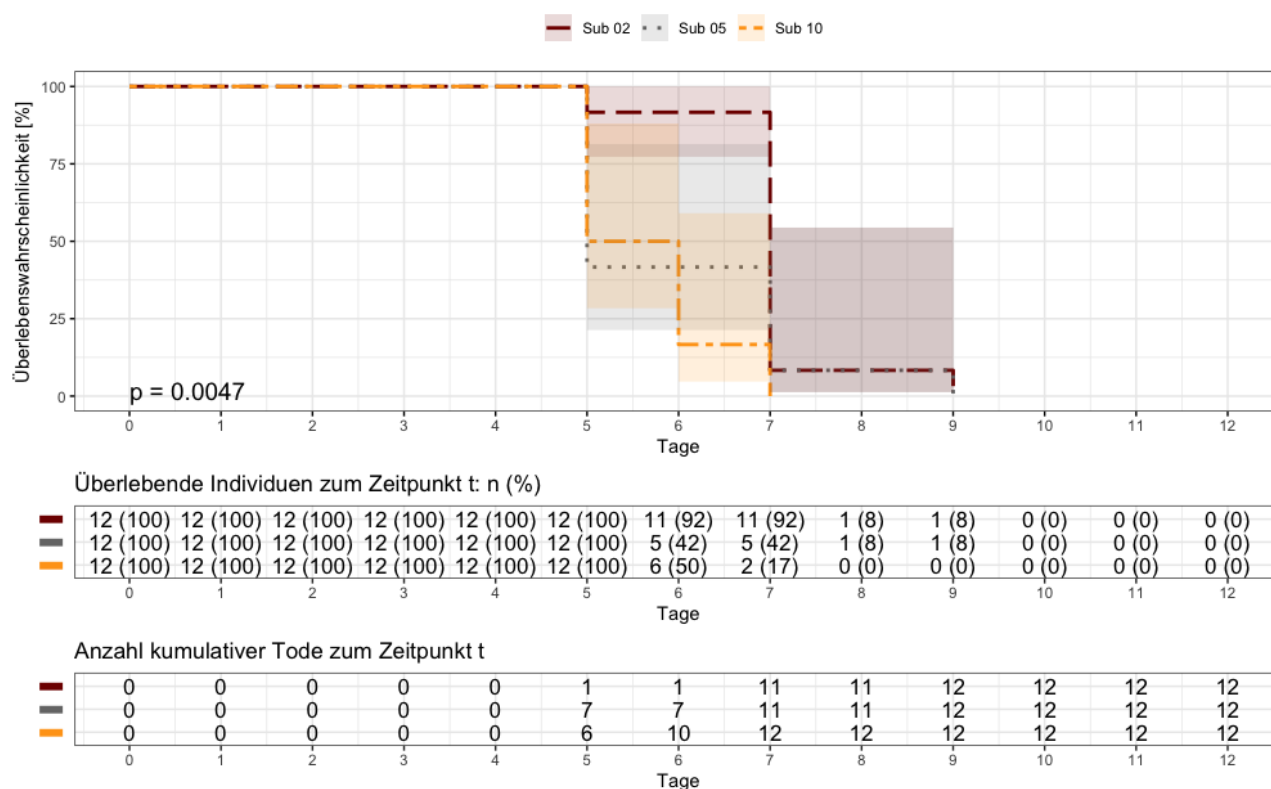


Abbildung B.6: Auswertung der *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 115) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell

Tabelle B.11: Tabellarische Darstellung der geschätzten  $LT_{50}$  der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen.

Subkultur	Anzahl Larven Beginn	Tode durch Pilzinfektion	Median ( $LT_{50}$ )	Unteres 95% Konfidenz-Level	Oberes 95% Konfidenz-Level
2.	12	12	7	7	NA
5.	12	12	5	5	NA
10.	12	12	5.5	5	NA

Tabelle B.12: Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF *M. brunneum* (Mykothek-Nr. 115).

	Tag	Überlebende Individuen	Tode	Zensierte Daten	Überlebens- wahrscheinlichkeit	Standard- fehler	Oberes 95% Konf-Int.	Unteres 95% Konf-Int.
2. Subkultur	5	12	1	0	0.917	0.087	1.000	0.773
	7	11	10	0	0.083	0.957	0.544	0.013
	9	1	1	0	0.000	Inf	NA	NA
5. Subkultur	5	12	7	0	0.417	0.342	0.814	0.213
	7	5	4	0	0.083	0.957	0.544	0.013
	9	1	1	0	0.000	Inf	NA	NA
10. Subkultur	5	12	6	0	0.500	0.289	0.880	0.284
	6	6	4	0	0.167	0.646	0.591	0.047
	7	2	2	0	0.000	Inf	NA	NA

## *M. robertsii* (Mykothek-Nr. 40)

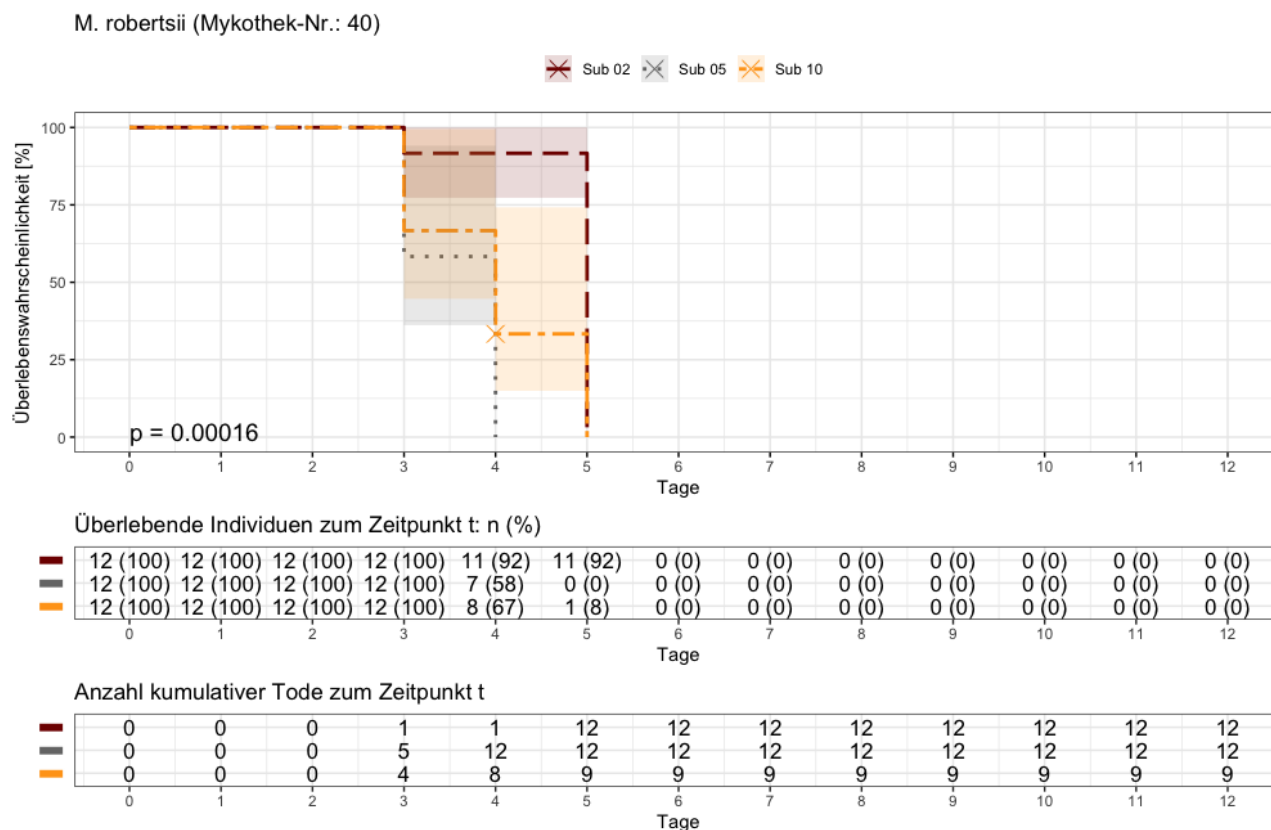


Abbildung B.7: Auswertung der *M. robertsii* (Mykothek-Nr. 40) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell

Tabelle B.13: Tabellarische Darstellung der geschätzten  $LT_{50}$  der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen.

Subkultur	Anzahl Larven Beginn	Tode durch Pilzinfektion	Median ( $LT_{50}$ )	Unteres 95% Konfidenz-Level	Oberes 95% Konfidenz-Level
2.	12	12	5	NA	NA
5.	12	12	4	3	NA
10.	12	9	4	3	NA

Tabelle B.14: Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF *M. robertsii* (Mykothek-Nr. 40).

	Tag	Überlebende Individuen	Tode	Zensierte Daten	Überlebens- wahrscheinlichkeit	Standard- fehler	Oberes 95% Konf-Int.	Unteres 95% Konf-Int.
2. Subkultur	3	12	1	0	0.917	0.087	1.000	0.773
	5	11	11	0	0.000	Inf	NA	NA
5. Subkultur	3	12	5	0	0.583	0.244	0.941	0.361
	4	7	7	0	0.000	Inf	NA	NA
10. Subkultur	3	12	4	0	0.667	0.204	0.995	0.447
	4	8	4	3	0.333	0.408	0.742	0.150
	5	1	1	0	0.000	Inf	NA	NA

M. robertsii (Mykothek-Nr. 75)

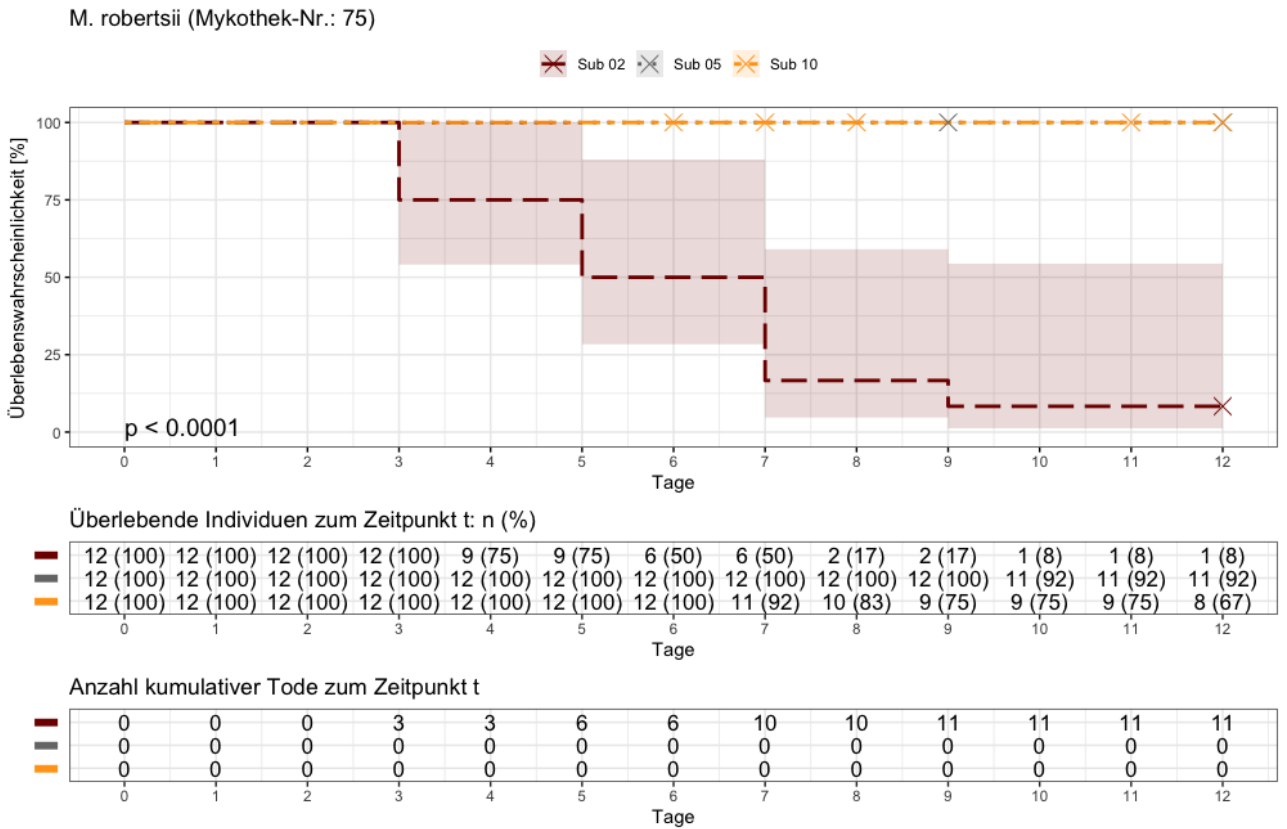


Abbildung B.8: Auswertung der *M. robertsii* (Mykothek-Nr. 75) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell

Tabelle B.15: Tabellarische Darstellung der geschätzten LT<sub>50</sub> der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen.

Subkultur	Anzahl Larven Beginn	Tode durch Pilzinfektion	Median (LT <sub>50</sub> )	Unteres 95% Konfidenz-Level	Oberes 95% Konfidenz-Level
2.	12	11	6	5	NA
5.	12	0	NA	NA	NA
10.	12	0	NA	NA	NA

Tabelle B.16: Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF *M. robertsii* (Mykothek-Nr. 75).

	Tag	Überlebende Individuen	Tode	Zensierte Daten	Überlebens- wahrscheinlichkeit	Standard-fehler	Oberes 95% Konf-Int.	Unteres 95% Konf-Int.
2. Subkultur	3	12	3	0	0.750	1.67	1.000	0.541
	5	9	3	0	0.500	0.288	0.880	0.284
	7	6	4	0	0.167	0.646	0.591	0.047
	9	2	1	0	0.083	0.957	0.544	0.128
	12	1	0	1	0.083	0.957	0.544	0.128
5. Subkultur	9	9	0	1	1.000	0.000	1.000	1.000
	12	12	0	11	1.000	0.000	1.000	1.000
10. Subkultur	6	12	0	1	1.000	0.000	1.000	1.000
	7	11	0	1	1.000	0.000	1.000	1.000
	8	10	0	1	1.000	0.000	1.000	1.000
	11	9	0	1	1.000	0.000	1.000	1.000
	12	8	0	8	1.000	0.000	1.000	1.000



I. fumosorosea (Mykothek-Nr. 138)

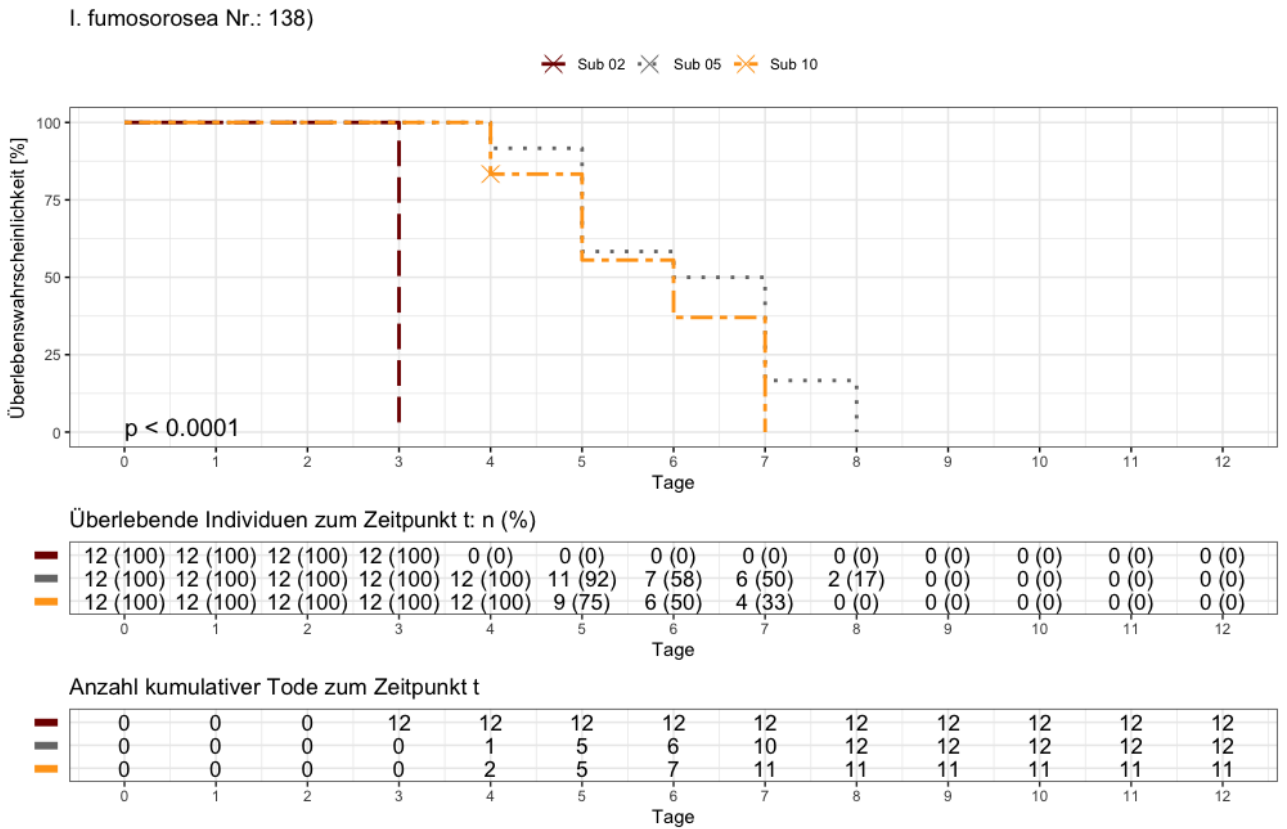


Abbildung B.9: Auswertung der *I. fumosorosea* (Mykothek-Nr. 138) Daten mit dem Kaplan-Meier-Modell

Tabelle B.17: Tabellarische Darstellung der geschätzten LT<sub>50</sub> der oberen Abbildung zuzüglich oberen und unteren 95% Konfidenz-Level. Die Werte der Konfidenz-Level entsprechen den vergangenen Versuchstagen.

Subkultur	Anzahl Larven Beginn	Tode durch Pilzinfektion	Median (LT <sub>50</sub> )	Unteres 95% Konfidenz-Level	Oberes 95% Konfidenz-Level
2.	12	12	3	NA	NA
5.	12	12	6.5	5	NA
10.	12	1	6	5	NA

Tabelle B.18: Zahlenwerte aus Kaplan-Meier-Plot des EPF *I. fumosorosea* (Mykothek-Nr. 138).

	Tag	Überlebende Individuen	Tode	Zensierte Daten	Überlebens- wahrscheinlichkeit	Standard- fehler	Oberes 95% Konf-Int.	Unteres 95% Konf-Int.
2. Subkultur	3	12	12	0	0.000	Inf	NA	NA
	4	12	1	0	0.917	0.087	1.000	0.773
	5	11	4	0	0.583	0.244	0.941	0.362
	6	7	1	0	0.500	0.289	0.880	0.284
5. Subkultur	7	6	4	0	0.167	0.646	0.591	0.047
	8	2	2	0	0.000	Inf	NA	NA
	4	12	2	1	0.833	0.129	1.000	0.647
	5	9	3	0	0.556	0.269	0.941	0.328
10. Subkultur	6	6	2	0	0.370	0.394	0.802	0.171
	7	4	4	0	0.000	Inf	NA	NA

## Appendix C: Abgabemodalitäten

### **Eidesstattliche Erklärung**


Mit der Abgabe dieser Bachelorarbeit versichert der/die Studierende, dass er/sie die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst hat.

Der/die Studierende erklärt, dass alle verwendeten Quellen (auch Internetseiten) im Text oder Anhang korrekt ausgewiesen sind, d.h. dass die Bachelorarbeit keine Plagiate enthält, also keine Teile, die teilweise oder vollständig aus einem fremden Text oder einer fremden Arbeit unter Vorgabe der eigenen Urheberschaft bzw. ohne Quellenangabe übernommen worden sind.

Bei Verfehlungen aller Art treten Paragraph 39 und Paragraph 40 der Rahmenprüfungsordnung für die Bachelor- und Masterstudiengänge an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften vom 29. Januar 2008 sowie die Bestimmungen der Disziplinarmaßnahmen der Hochschulordnung in Kraft.

Weiter erkläre ich mich damit einverstanden, dass meine Arbeit elektronisch gespeichert und in der ZHAW Digitalcollection der ZHAW Hochschulbibliothek öffentlich zugänglich gemacht wird. Das Recht, die Arbeit an anderer Stelle zu veröffentlichen, wird durch diese Erklärung grundsätzlich nicht berührt. Ich bin damit einverstanden, dass die Arbeit, namentlich zum Zweck der Archivierung, in andere Dateiformate konvertiert oder anderweitig technisch verändert wird. Ich versichere, dass der Veröffentlichung der Arbeit keine Rechte Dritter, insbesondere in Bezug auf im Werk enthaltenen Abbildungen, entgegenstehen.

# Aufgabenstellung

 <small>Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften</small> <b>Life Sciences und Facility Management</b>	<b>Aufgabenstellung für die Projekt-, Literatur-, Semester-, Bachelorarbeit und Master Thesis</b>	Code: Seite: 1 / 4 Datum: 21.02.2019
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------

Institut für Umwelt und natürliche Ressourcen

## Modul: Bachelorarbeit

<b>Studienjahrgang</b>		SBUI 16
<b>Titel</b>		<b>Screening entomopathogener Pilze mit Potential zur Formulierung von Bioagentien</b>
<b>Vertraulich</b>		<input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> <b>nein</b>
<b>Fachgebiet</b>		Phytomedizin
<b>Namen</b>	StudentIn	Adrian Rutzer Gugelmattstrasse 34, 8967 Widen Tel.: 076 476 20 40 E-Mail: <a href="mailto:rutzeadr@students.zhaw.ch">rutzeadr@students.zhaw.ch</a>
	1. KorrektorIn	Prof. Dr. Jürg Grunder ZHAW Life Sciences und Facility Management, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, Grüental, 8820 Wädenswil Tel.: 058 934 55 89 E-Mail: <a href="mailto:juerg.grunder@zhaw.ch">juerg.grunder@zhaw.ch</a>
	2. KorrektorIn	Dr. Esther Fischer ZHAW Life Sciences und Facility Management, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, Grüental, 8820 Wädenswil Tel.: 058 934 57 70 E-Mail: <a href="mailto:esther.fischer@zhaw.ch">esther.fischer@zhaw.ch</a>

<b>Aufgabenstellung</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ausgangslage</b></li> <li>• <b>Zielsetzungen</b></li> <li>• <b>Zusätzliche Auftragsmodalitäten</b></li> </ul>	<b>Ausgangslage</b> <p>Gut durchdachte Biotests sind von zentraler Bedeutung für die erfolgreiche Entwicklung von Pflanzenschutzprodukten mit Pilzen. Biotests sind Werkzeuge um das Wirtsspektrum, die Virulenz oder die ökologische Kompetenz (z.B. Leistungen unter Feldbedingungen) zu untersuchen. Dies verbunden mit der Tatsache, dass es eine Vielzahl von entomopathogenen Pilzen mit einer ebenso grossen Anzahl unterschiedlicher Wirte gibt, lässt die Fülle möglicher Biotests grenzenlos erscheinen. Aus diesem Grund ist es essentiell Biotests entsprechend dem Wirts-, Krankheitserreger- und Biotestziel anzupassen. Bodentextur, Feuchtigkeit und mikrobielle Flora können die konidiale Lebensfähigkeit und Virulenz beeinträchtigen und müssen berücksichtigt werden.</p> <b>Zielsetzung</b> <p>In dieser Arbeit wird die Virulenz verschiedener entomopathogener Pilzstämme, die während einer Masterarbeit der ZHAW Wädenswil isoliert wurden, überprüft. Im Weiteren sollen die Grundlagen von Biotest für entomopathogene Pilze mit möglichst weitreichenden Anwendungsspektrum erarbeitet werden. Zielorganismen sind Insekten, die während eines Teils ihres Lebenszyklus entweder im Boden leben oder mit ihm in Verbindung stehen. Die in dieser Arbeit verwendeten Pilze stammen aus der Mykothek der ZHAW Wädenswil. Die Versuche werden mit Galleria-Larven durchgeführt.</p> <b>Weiterführend</b> <p>Auf Basis der damit erarbeiteten Grundlagen können als weiterführende Optionen unterschiedliche Pilze an verschiedenen Insekten auf ihre Pathogenität untersucht werden. Diese Bachelorarbeit umfasst eine Literaturrecherche zum Stand der Forschung geeigneter entomopathogener Pilze als Bioagentien. In Laborversuchen werden die Grundlagen für weitere Optimierungen des Biotests erarbeitet.</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p><b>Zusätzliche Auftragsmodalitäten</b></p> <p><u>Erwartete Resultate</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bachelorarbeit, gem. Weisungen ZHAW</li> <li>▪ Zusätzlich: Abgabeform: - Digital - Poster und Präsentation</li> </ul> <p><u>Provisorisches Inhaltsverzeichnis</u></p> <p>Zusammenfassung</p> <p>Inhaltsverzeichnis</p> <p>Liste der Abkürzungen</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Einleitung             <ol style="list-style-type: none"> <li>1.1. Ziel der Arbeit</li> <li>1.2. Insektenpathogene Pilze - Stand der Forschung                 <ol style="list-style-type: none"> <li>1.2.1. Untersuchte Pilze</li> <li>1.2.2. Biotest</li> </ol> </li> </ol> </li> <li>2. Material und Methoden             <ol style="list-style-type: none"> <li>2.1. Versuchsaufbau                 <ol style="list-style-type: none"> <li>2.1.1. Optimierung Biotest</li> <li>2.1.2. Screening insektenpathogener Pilzstämmen</li> </ol> </li> <li>2.2. Versuchsdurchführung                 <ol style="list-style-type: none"> <li>2.2.1. Optimierung Biotest</li> <li>2.2.2. Screening insektenpathogener Pilzstämmen</li> </ol> </li> <li>2.3. Versuchsmethoden                 <ol style="list-style-type: none"> <li>2.3.1. Erstellen der Sporenlösungen</li> <li>2.3.2. Auswertung Biotests</li> <li>2.3.3. Auswertung Screening</li> <li>2.3.4. Statistische Auswertung</li> </ol> </li> </ol> </li> <li>3. Ergebnisse             <ol style="list-style-type: none"> <li>3.1. Optimierung Biotest</li> <li>3.2. Screening insektenpathogener Pilzstämmen</li> </ol> </li> <li>4. Diskussion             <ol style="list-style-type: none"> <li>4.1. Optimierung Biotest</li> <li>4.2. Screening insektenpathogener Pilzstämmen</li> </ol> </li> <li>5. Konklusion und Ausblick</li> </ol> <p>Literaturverzeichnis</p> <p>Abbildungsverzeichnis</p> <p>Tabellenverzeichnis</p> <p>Anhang</p>
<p><b>Formale Anforderungen</b></p>	<p><i>Die Weisungen zur Arbeit müssen gelesen und erfüllt sein.</i></p> <p><a href="https://www.zhaw.ch/de/lsfm/studium/studiweb/bachelor/pruefungen-und-studentische-arbeiten/">https://www.zhaw.ch/de/lsfm/studium/studiweb/bachelor/pruefungen-und-studentische-arbeiten/</a></p>

<b>Termine</b>	<i>Siehe Anhang</i>	
<b>Abgabetermin</b>	Donnerstag, 24. Oktober 2019, 12.00 Uhr	
<b>Bemerkungen (z.B. Budgetplan)</b>	<b>Abgabeform:</b> Arbeit: Schriftlich in gebundener Form und elektronisch (Completis, Korrektoren) Poster und Präsentation  Finanzen: <input type="checkbox"/> Nein (es werden keine Kosten entstehen) <input checked="" type="checkbox"/> Ja (Budgetplan 300.- von IUNR allgemein)	
<b>Arbeitsort</b>	ZHAW Wädenswil	
<b>Unterschrift KorrektorIn 1</b>  Ort, Datum  _____		<b>Unterschrift KorrektorIn 2</b>  Ort, Datum  _____
<b>Unterschrift StudentIn</b>  Ort, Datum  _____		

Plagiate verstossen gegen die Urheberrechte, eine Verletzung dieser Rechte wird gemäss der Studien- und Prüfungsordnung für die Bachelorstudiengänge der Hochschule Wädenswil vom 01.09.2006 in § 38, 39 geregelt

XX

## Poster

# Screening entomopathogener Pilze mit Potenzial zur Formulierung von Bioagentien

von Adrian Rützer

DEPARTEMENT FÜR LIFESCIENCE UND FACILITY MANAGEMENT (INSTITUT UINR)

Zürcher Hochschule  
für Angewandte Wissenschaften



## Zusammenfassung

Entomopathogene Pilze sind vielversprechende Alternativen zur chemisch-synthetischen Schädlingsbekämpfung. Ein ernstzunehmendes Problem bei der (Massen-) Vermehrung mit Konidium-zu-Konidium-Zyklen ist die Abnahme ihrer Virulenz gegenüber dem Zielorganismus. Dieses Phänomen kann unter anderem mit morphologischen Degenerationen (veränderte Wachstumsrate und Farbe oder reduzierter Sporulation) durch serielles Subkultivieren hervorgerufen werden.

Hauptziele dieser Arbeit waren die Bestimmung der Virulenz ausgewählter Pilzstämme und deren Verlust bei zehnmaligen, seriellen Subkultivieren auf frische Nährmedien. Die Resultate bestätigen das Phänomen der Abnehmenden Virulenz und die daraus entstehenden Schwierigkeiten bei der Massenproduktion von entomopathogenen Pilzen. Aus den Versuchen können entscheidende Rückschlüsse über die sachgerechte Handhabung einer Mykothek gezogen werden. Die Arbeit und kann als Grundlage für weitere Untersuchungen ähnlicher Art genutzt werden.

## Einleitung

Abnehmende Virulenz und morphologische Degenerationen führen zwangsweise zu Produkten minderer Qualität. Die Virulenz entomopathogener Pilze und ihre Konsistenz ist daher ein massgebliches Auswahlkriterium für Pilzstämme mit Potenzial zur Kommerzialisierung.

## Zielsetzung

- Bestimmung der Virulenz neu isolierter Pilzstämme
- Ermittlung des Virulenzverlustes nach zehnfach-serialer Subkultivierung
- Nachweis möglicher Veränderungen in der Wachstumsrate
- Nachweis möglicher Veränderungen im Phänotyp (hier Form und Farbe)
- Empfehlung von Pilzstämmen für weitere Untersuchungen

## Materialien

- zwei Pilzstämme von *Beauveria bassiana*, *Menthastrum anisopliae*, *M. brunneum* und *M. robertii*, sowie ein Stamm von *Isaria fumosorosea*
- Zielinsekt: *Galleria mellonella* (Grosse Wachsmotte)
- Flächenmessung: Planimeter (Planix3)
- Inokulation Pilzkulturen: Corn Steep-Agar

## Methoden

Durchführung von Mortalitätsanalysen der 2., 5. und 10. Subkultur jedes Pilzstammes:

- Messung Wachstumsrate nach zwei Wochen
- Isolation der Pilzsporen nach fünf Wochen
- Inokulation der *G. mellonella*-Larven
- Tägliche Erhebung der Mortalität über zwölf Tage

## Resultate

### Veränderungen der Wachstumsraten

- B. bassiana* keine signifikante Abnahme
- M. anisopliae* (Nr. 125):  $p = 0.0000201$
- M. brunneum* (Nr. 38):  $p = 0.0001928$
- M. robertii* (Nr. 75):  $p = 0.0211$
- I. fumosorosea* (Nr. 138):  $p = 0.000742$

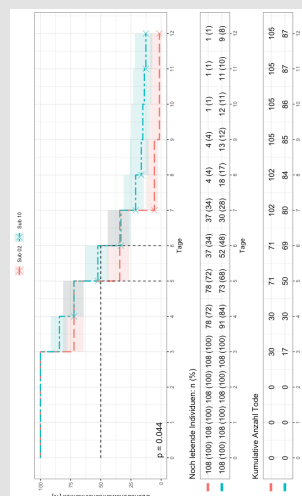
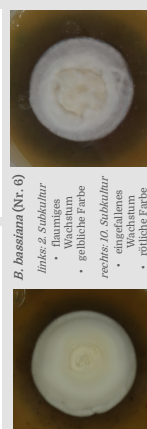
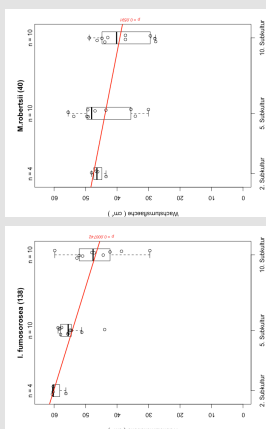
Die Wachstumsrate reduzierte sich bei vier der neun untersuchten Pilzstämme signifikant. Diese Reduktion darf aber nicht verallgemeinert werden (Exakter Fisher-Test:  $p = 0.115$ ). Eine klare Tendenz ist jedoch erkennbar.

### Morphologische Degeneration

Kulturen wurden im Alter von zwei Wochen fotografisch festgehalten. Veränderungen in Form und Farbe konnten nachgewiesen werden.

### Mortalitätsanalyse

- Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeit zum Zeitpunkt  $t$  der Versuchsdauer mit dem Kaplan-Meier Modell.
- Berücksichtigung zensierter Daten: Insekten, die nicht an einer Pilzinfektion verendet, wurden aus folgenden Berechnungen der Überlebenswahrscheinlichkeit ausgeschlossen
- Plot beinhaltet die Daten aller Pilzstämme. Pro Mortalitätsanalyse und Pilzstamm wurden 12 *G. mellonella*-Larven verwendet.



## Konklusion

Die «blau» markierten Pilze werden für weitere Untersuchungen empfohlen.

EPF	Vermindertes Wachstum	Morphologische Degeneration	LT <sub>50</sub> zu Beginn der Virulenz	Abnahme der Virulenz
<i>B. bassiana</i> (Nr. 6)		X	7	
<i>B. bassiana</i> (Nr. 19)			7	
<i>M. anisopliae</i> (Nr. 74)			6	
<i>M. anisopliae</i> (Nr. 125)	X	X	5	
<i>M. brunneum</i> (Nr. 38)	X		5	X
<i>M. brunneum</i> (Nr. 115)		X	7	
<i>M. robertii</i> (Nr. 40)			5	
<i>M. robertii</i> (Nr. 75)	X	X	6	X
<i>I. fumosorosea</i> (Nr. 138)	X	X	3	X

## Weiterführende Forschungsfragen

- Die genauere Untersuchung bestimmter EPF gegenüber *M. robertii*.
- Die genauere Untersuchung potentieller Biogentien auf Basis entomopathogener Pilze gegenüber Nicht-Zielorganismen.
- Langzeittest mit entomopathogenen Pilzen über deren Beständigkeit unter Feldbedingungen.
- Entomopathogene Pilze als Endophyten?
- Die Bestimmung einer Korrelation zwischen abnehmender Virulenz von entomopathogenen Pilzen und morphologischer Degeneration.

## Danksagung

Ich möchte mich bei meinen Betreuer Prof. Dr. Jürg Grunz und Dr. Esther Fischer für die Zusammenarbeit bedanken. Besonderen Dank geht an Ursula Löffel, die mich in allen Laborangelegenheiten vollumfänglich unterstützt hat. Für die statistischen Erläuterungen danke ich Dr. Matthias Nyfeler.